

(19) 日本国特許庁 (JP) (12) 公表特許公報 (A) (11) 特許出願公表番号  
特表平8-500010  
(43) 公表日 平成8年(1996)1月9日

(51) Int.Cl. <sup>4</sup> C12P 21/02 A61K 38/00 38/22	識別記号 ZNA C 9282-4B	片内整理番号 F I
	9281-4B 7729-4B	C12N 15/00 5/00 A B
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 91 頁) 最終頁に続く	
(21) 出願番号 (86) (22) 出願日 (85) 翻訳文提出日 (86) 国際出願番号 (87) 国際公開番号 (87) 国際公開日 (31) 優先権主張番号 (32) 優先日 (33) 優先権主張国 (31) 優先権主張番号 (32) 優先日 (33) 優先権主張国	特願平8-503745 平成5年(1993)5月13日 平成6年(1994)11月15日 PCT/US93/04550 WO93/23068 平成5年(1993)11月25日 07/883,949 1992年5月15日 米国 (US) 07/977,234 1992年11月16日 米国 (US)	(71) 出願人 ルードヴィッヒ・インスティテュート・フ ォア・キャンサー・リサーチ アメリカ合衆国 ニューヨーク 10105 ニューヨーク アベニュー・オブ・ジ・ア メリカズ 1945 (72) 発明者 ヴァスヴォトン, フレミング, エス スウェーデン国 エス・751 24 ウプサ ラ (無国籍) (72) 発明者 アンダーソン, マリア スウェーデン国 エス・751 24 ウプサ ラ (無国籍) (74) 代理人 弁理士 北村 修

(54) 【発明の名称】 血小坂由来の増殖因子アンタゴニスト

(57) 【要約】  
本発明はPDGFFに対するアンタゴニスト (拮抗剤) を記載している。アンタゴニストはアミノ酸を含み、単量体でも二量体でもよい。特に好適なものは、PDGFRセプタを結合するが、結合したレセプタの二量化を阻止する二量体である。二量化はPDGFR効果つまりアンタゴニスト効果に必要である。アンタゴニストをつくる核酸配列と、その物質に感染した細胞系も記載されている。図は、PDGFR-AのHPLC実験から分離されたペプチドのアミノ酸配列を示す。

FIG. 7B

SIEEAVPAVCCKTRTVIYIETPRSQVDPTSANFLIWP  
SP4-----S  
PCVEVKRCTGCGNTSSVKCOPSRVHRSVKVAKVE  
SP3-----S  
YVRKKPKLKEVQVRLSEHLECACTTSLNPDYREE  
SP2-----S  
DTGRPRESGKKKKKKLKP

【特許請求の範囲】

1. 血小坂由来の増殖因子に対する、分離されたアミノ酸を含むアンタゴニスト。
2. PDGFAにもPDGFBにも見いだせないアミノ酸配列からなる請求項1のアンタゴニスト。
3. アミノ酸配列Ala Asp Phe Leu Val X (Y) n Glu Ile Val Arg Lys Lys Proを持ち、ここで、Xはトリプトファンまたは変成トリプトファン残基、Yは任意のアミノ酸、nは0から35の数の数である請求項2のアンタゴニスト。
4. アミノ酸配列:  
Ala Asn Phe Leu Val X Glu Ile Val Arg Lys Lys Pro  
Xがチオアニソール化トリプトファンか2-ニトロフェニルスルフェニル誘導体である請求項1のアンタゴニスト。
5. 前記アンタゴニストがアミノ酸配列:  
Ala-Asn-Phe-Leu-Val-X-Pro-Pro-Cys-Val-Glu-Val-Gln-Leu-Arg-Pro-Val-Gln-Val-Arg-Lys-Ile-Glu-Ile-Val-Arg-Lys-Lys-Pro  
からなり、ここで、Xはトリプトファンまたは変成トリプトファン残基である請求項4のアンタゴニスト。
6. Xがチオアニソール化トリプトファンか2-ニトロフェニルスルフェニル誘導体である請求項1のアンタゴニスト。
7. 前記アンタゴニストがアミノ酸配列:  
Ala-Asn-Phe-Leu-Val-X-Pro-Pro-Cys-Val-Glu-Val-Gln-Leu-Arg-Pro-Val-Gln-Val-Arg-Lys-Ile-Glu-Ile-Val-Arg-Lys-Lys-Pro  
からなり、ここで、Xはトリプトファンまたは変成トリプトファン残基である請求項4のアンタゴニスト。
8. Xがチオアニソール化トリプトファンか2-ニトロフェニルスルフェニル誘導体である請求項1のアンタゴニスト。
9. PDGFRセプタを提示する細胞へのPDGFRの結合を阻害する方法であって、前記細胞を含むサンプルに、前記細胞に対するPDGFRの結合を阻害するに十分な量の、請求項1のアンタゴニストを加えることからなるもの。

9. いずれかの単量体上のアミノ酸 123か、いずれかの単量体上のアミノ酸 132の少なくとも一方がシステインでなく、前記変成二量体が野生型 P D C F A A に対するアンタゴニストである、分離された変成 P D C F A A 二量体。
10. 一方の単量体上のアミノ酸 123と他方の単量体上のアミノ酸 132がシステインでない請求項9の分離された変成 P D C F A A 二量体。
11. いずれかの単量体上のアミノ酸 124か、いずれかの単量体上のアミノ酸 133の少なくとも一方がシステインでなく、前記変成二量体が野生型 P D C F B B に対するアンタゴニストである、分離された変成 P D C F B B 二量体。
12. 一方の単量体上のアミノ酸 124と他方の単量体上のアミノ酸 133がシステインでない請求項11の分離された変成 P D C F B B 二量体。
13. (i) P D C F A の単量体または P D C F B の単量体 と (ii) 非 P D C F 単量体からなり、前記2つの単量体が1個のジスルフィド結合によってつながれ、前記二量体が P D C F アンタゴニストである、分離された二量体。
14. 前記非 P D C F 単量体が増強因子である請求項13の分離された二量体。
15. 前記非 P D C F 単量体が V E C F である請求項13の分離された二量体。
16. 前記アンタゴニストが二量体である請求項1のアンタゴニスト。
17. 前記アンタゴニストが変成 P D C F - A 分子である請求項1のアンタゴニスト。
18. 前記二量体が1つの変成 P D C F - A 分子からなる請求項16のアンタゴニスト。
19. 前記変成 P D C F - A 分子がアミノ酸位置 156~162で変成されている請求項16のアンタゴニスト。
20. 前記変成 P D C F - A 分子が位置 156~162にアミノ酸配列 K P H Q G Q C を持つ請求項19のアンタゴニスト。
21. 前記アンタゴニストが変成 P D C F - B 分子である請求項1のアンタゴニスト。
22. 前記二量体が1つの変成 P D C F - B 分子からなる請求項16のアンタゴニスト。

- ニスト。
23. 前記変成 P D C F - B 分子がアミノ酸位置 156~162で変成されている請求項21のアンタゴニスト。
24. 前記変成 P D C F - B 分子がアミノ酸位置 156~162で変成されている請求項22のアンタゴニスト。
25. 前記変成 P D C F - B 分子が位置 156~162にアミノ酸配列 K P H Q G Q H を持つ請求項23のアンタゴニスト。
26. 前記変成 P D C F - B 分子が位置 156~162にアミノ酸配列 K P H Q G Q H を持つ請求項24のアンタゴニスト。
27. いずれかの単量体上のアミノ酸 123か、いずれかの単量体上のアミノ酸 132の少なくとも一方がシステインでなく、前記単量体がアミノ酸位置 156~162で変成されていることを条件として、前記二量体が P D C F - A A 二量体である請求項16の分離されたアンタゴニスト。
28. 前記二量体が、前記二量体の2つの単量体をつなぐ1本のシステイン結合を持っている請求項16の分離されたアンタゴニスト。
29. 前記単量体の一方が変成 P D C F - A 分子である請求項28の分離されたアンタゴニスト。
30. 前記変成 P D C F - A 分子がアミノ酸 156~162のところで変成されている請求項29の分離されたアンタゴニスト。
31. 前記変成 P D C F - A 単量体がアミノ酸位置 156~162にアミノ酸 K P H Q G Q H を持つ請求項30の分離されたアンタゴニスト。
32. 前記二量体が1つの変成 P D C F - B 分子をさらに備えた請求項18のアンタゴニスト。
33. 前記二量体が1つの変成 P D C F - B 分子をさらに備えた請求項19のアンタゴニスト。
34. 前記二量体が1つの変成 P D C F - B 分子をさらに備えた請求項20のアンタゴニスト。

35. 請求項17のアンタゴニストをコード化する分離

された核配列。

36. 請求項19のアンタゴニストをコード化する分離された核配列。

37. 請求項21のアンタゴニストをコード化する分離された核配列。

38. プロモーターに作用的に連鎖した請求項35の核配列からなる発現ベクター。

39. プロモーターに作用的に連鎖した請求項37の核配列からなる発現ベクター。

40. プロモーターに作用的に連鎖した請求項36の核配列からなる発現ベクター。

41. pSV7d-PDGF-Oで表される請求項40の発現ベクター。

42. 請求項35の核配列に感染した細胞系。

43. 前記細胞系が真核細胞系である請求項42の細胞系。

44. 前記真核細胞系がCOS細胞系である請求項43の細胞系。

45. 前記細胞系がPDGF-Bを生成する請求項35の細胞系。

46. 前記細胞系にPDGF-Bをコード化する核配列に感染した請求項45の細胞系。

47. 請求項21のアンタゴニストをコード化する核配列に感染した細胞系。

48. 前記細胞系がPDGF-Aを生成する請求項47の細胞系。

49. 前記細胞系にPDGF-Aをコード化する核配列に感染した請求項48の細胞系。

50. PDGFアンタゴニストの生成に有用なキットであって、それぞれがPDGF単量体をコード化する第1および第2核配列の別々の部分からなり、前記PDGF単量体の一方がPDGFレセプタとの結合を阻害するよう変成され、他方のPDGF単量体が正常なPDGF単量体であるキット。

51. 前記変成されたPDGF単量体が変成PDGF-Aであり、前記正常なPDGF単量体がPDGF-Bである請求項50のキット。

52. 前記変成されたPDGF単量体が変成PDGF-Bであり、前記正常なPDGF単量体がPDGF-Aである請求項51のキット。

53. 前記変成されたPDGF単量体が変成PDGF-Aであり、前記正常なPDGF単量体が正常なPDGF-Aである請求項50のキット。

54. 前記変成されたPDGF単量体が変成PDGF-

Bであり、前記正常なPDGF単量体が正常なPDGF-Bである請求項50のキット。

55. PDGF単量体の前記一方がアミノ酸位置156~162で変成されている請求項50のキット。

56. 患者に対するPDGF-Bの悪影響を抑制する方法であって、前記患者に、PDGF-Bの悪影響を抑制するに十分な量の、請求項1のアンタゴニストを投与することからなるもの。

57. 前記悪影響が細胞感染である請求項56の方法。

58. 前記アンタゴニストがPDGF-OBである請求項56の方法。

59. 残基124および133がシステインでないことを条件として、PDGF-B単量体のアミノ酸配列を持った、分離された血小板由来の増殖因子アゴニスト。

60. 残基124および133の少なくとも一方がセリンである請求項59の分離された血小板由来の増殖因子アゴニスト。

61. 残基124および133の両方がセリンである請求項59の分離された血小板由来の増殖因子アゴニスト。

62. 残基124および133がシステインでないことを条件として、PDGF-A単量体のアミノ酸配列を

持った、分離された血小板由来の増殖因子アゴニスト。

63. 残基124および133の少なくとも一方がセリンである請求項62の分離された血小板由来の増殖因子アゴニスト。

64. 残基124および133の両方がセリンである請求項62の分離された血

小坂由来の増殖因子アゴニスト。

65. 請求項59のアゴニストをコード化する分離された核酸分子。
66. 請求項62のアゴニストをコード化する分離された核酸配列。
67. 請求項65の分離された核酸配列を含むプラスミド。
68. 請求項66の分離された核酸配列を含むプラスミド。
69. 1個の分子間ジスルフィド結合を持ったPDGF二量体の産生に有用なキットであって、それぞれがPDGF単量体をコード化する第1および第2核酸配列の別々の部分からなり、前記第1および第2核酸分子の一方が、正常なPDGF単量体の第2および第4システイン部分でシステインをコード化しないよう変成されたもの。
70. 前記第1および第2核酸分子の一方が、正常なPDGF単量体の第2システイン部分でシステインをコード化しないよう変成され、他方の核酸分子が、正常なPDGF単量体の第4システイン部分でシステインをコード化しないよう変成された請求項69のキット。
71. 前記第1および第2核酸分子がPDGF Aをコード化する請求項69のキット。
72. 前記第1および第2核酸分子がPDGF Bをコード化する請求項69のキット。
73. 前記第1および第2核酸分子の一方がPDGFAをコード化し、前記第1および第2核酸分子の他方がPDGF Bをコード化する請求項69のキット。
74. 請求項65の分離された核酸分子に感染した細胞系。
75. 請求項66の分離された核酸分子に感染した細胞系。
76. 細胞に対するPDGF効果を増進する方法であって、PDGFの影響を増進するに十分な量の、請求項59のPDGFアゴニストを投与することからなるもの。
77. 細胞に対するPDGF効果を増進する方法であって、

て、PDGFの影響を増進するに十分な量の、請求項60のPDGFアゴニスト

を投与することからなるもの。

78. いずれかの単量体上のアミノ酸123か、いずれかの単量体上のアミノ酸132の少なくとも一方がシステインでない、分離されたPDGF AA二量体。
79. 一方の単量体上のアミノ酸123と他方の単量体上のアミノ酸132がシステインでない請求項78の分離されたPDGF AA二量体。
80. いずれかの単量体上のアミノ酸124か、いずれかの単量体上のアミノ酸133の少なくとも一方がシステインでない、分離されたPDGF BB二量体。
81. 一方の単量体上のアミノ酸124と他方の単量体上のアミノ酸133がシステインでない請求項80の分離されたPDGF BB二量体。
82. (1) PDGF Aの単量体またはPDGF Bの単量体、と(11)非PDGF単量体からなり、前記2つの単量体が1個のジスルフィド結合によってつながれた、分離された二量体。
83. 前記非PDGF単量体が増殖因子である請求項82の分離された二量体。
84. 前記非PDGF単量体がVEGFである請求項82
- の分離された二量体。

【発明の詳細な説明】

血小板由来の増殖因子アンタゴニスト

関連出願

この出願は、1992年5月15日出願のアメリカ特許出願連続番号第88

3,949号の一部継続である。

発明の分野

この発明は、血小板由来の成長因子つまり「PDGF」として知られる分子のアンタゴニストに関する。より具体的には、PDGF-Bに対する、単量体と二量体の両方の、アミノ酸含有アンタゴニストに関する。アンタゴニストの調製に有用な種々の核酸塩基物質と、その使用も説明する。

背景および従来技術

PDGFは当初、平滑筋細胞と繊維芽細胞に対して成長促進作用を持つ血小板α顆粒の成分として認識された(ヘルディン・アンド・ウエスタマーク、セル・レギュレーション:555-56(7-90)(Heldin and Westermarck, Cell Regul.: 555-56(7-90))。また、それは、結合組織由来の細胞の生体外的刺激で(イーストマン他、ジェイ・バイオ・ケム263(31)):

16202-16208(11-88)(Bestman et al., J. Biol. Chem. 263(31): 16202-16208(11-88))、間充細胞に対する主要なマイトジェンバク質として(マレー他(Murray et al.)、アメリカ特許第4,889,919号および第4,845,075号)、そして培養された筋肉細胞、繊維芽細胞および膠細胞における細胞増殖とDNA合成の誘導物質として(ケリー他(Kelly et al.)、国際出願W90/14425(11-29-90))示された。また、それは癌の治療反応に関与することが示され(ロス他、エヌ・イング・ジェイ・メド295:369(1976)(Rosset al., N. Eng. J. Med. 295: 369(1976))、動脈硬化症の増殖性損傷の原因となる役割に関与する可能性もある(上記ロス)。他の者は、この分子が腫瘍の発達と、非悪性で増殖性のある腫瘍の仲介物である可能性を示唆した(上記ヘルディン他)。

PDGF分子は非常によく特徴づけられている。それは、ジスルフィド結合を介して互いに結び付いた「A」鎖および「B」鎖のヘテロダイマーとして存在することが知られている。その二量体は、ときどき「PDGF-AB」と呼ばれるが、約30KDaの分子質量を持つ。AおよびB鎖のアミノ酸配列が知られており、例えばマレー他(Murray et al.)のアメリカ特許第4,889,919号および第4,845,075号に示されているが、その開示を言及することで本書に取り入れる。成熟鎖は100個より少し多いアミノ酸を含み、約60%相同である(上記ヘルディン他)。

PDGF分子は非常によく特徴づけられている。それは、ジスルフィド結合を介して互いに結び付いた「A」鎖および「B」鎖のヘテロダイマーとして存在することが知られている。その二量体は、ときどき「PDGF-AB」と呼ばれるが、約30KDaの分子質量を持つ。AおよびB鎖のアミノ酸配列が知られており、例えばマレー他(Murray et al.)のアメリカ特許第4,889,919号および第4,845,075号に示されているが、その開示を言及することで本書に取り入れる。成熟鎖は100個より少し多いアミノ酸を含み、約60%相同である(上記ヘルディン他)。

二量体PDGF-AAおよびPDGF-BBは組換え手段によって生成され、自然源から分離されている(上記マレー他、上記ヘルディン他を参照)。種々の二量体、つまり"イソ型"は、機能的および分泌作用が異なる。

PDGFが細胞に作用するメカニズムが綿密に調べられ、PDGFに2種のレセプタ、「α」および「β」レセプタ、があることが証明された。αレセプタはすべて

のイソ型を結合し、βレセプタはPDGF-AAを結合せず、PDGF-ABを低親和力で結合し、PDGF-BBを高親和力で結合する(上記ヘルディン他、上記イーストマン他)。αレセプタは170KDaのものに成熟する140KDa前駆タンパク質として合成され、βレセプタは160KDaの前駆体および180KDaの成熟分子として認識される。両レセプタのcDNAも分離されてい

る（上記ヘルペジン他、上記ケリー他）。

両レセプタは、5個の免疫グロブリン状のドメイン（細胞外部分）と、キナーゼドメインと相同性を持たない特異的挿入配列を持ったプロテインチロシンキナーゼドメインを含む細胞内タンパク質からなる（ヤーデン他、ネイチャー 323 : 226~232 (1986) ; マツイ他、サイエンス 243 : 800~803 (1989) ; クレノン・ヴェルシュ他、PNAS 86 : 4917~4921 (1989) ; Yarden et al., Nature 323 : 226-232 (1986) ; Matsui et al., Science 243 : 800-803 (1989) ; Claesson-Welsh et al., PNAS 86 : 4917-4921 (1989)）。PDGFがこれらのレセプタに結合すると、レセプタ分子の二量体化が誘発され、引き続きレセプタのキナーゼ活性と自動加糖酸化が生じる（ヘルペジン他、ジェイ・バイオル・ケム 264 : 8905~8912 (1989) ; ザイファート他、ジェイ・バイオル・ケム 264 : 8771~8778 (1989) ; ビシャイ他、ジェイ・バイオル・ケム 264 : 11699~11705 (1989) (Heidin et al., J. Biol. Chem. 264 : 8905-8912 (1989) ; Selfert et al., J. Biol. Chem. 264 : 8771-8778 (1989) ; Bishayee et al., J. Biol. Chem. 264 : 11699-11705 (1989)）。

PDGFの多様な作用と病状への示唆された関与は、アゴニスト（作用物質）とアンタゴニスト（反作用物質）の使用かPDGFの作用を阻害し、一部の障害を和らげるのに有用である可能性を示している。これらの分子は、上記ケリー他が採用した定義を使えば、PDGFの効力によく似る（アゴニスト）か、レセプタとリガンドの相互作用を阻止する（アンタゴニスト）かのどちらかである。

種々の物質に対してアゴニストとアンタゴニストが存在することが古くから認められ、ケリー他はその記載を通じて、事実上、PDGFに対してこれらが存在することを推定している。しかし、文献を調べてみても、PDGFに対するタンパク質性のアゴニストおよびアンタゴニストは教示されていない。上記の理由で、そのような物質を確保することが望ましい。

マレー他の上記2件の特許は、分子の生物学的活性を破壊しないことを条件に

、単量体の鎖のシステイン残基のアミノ酸置換の可能性を記載している。919号特許は、総じてPDGF-AA分子の変成を教示している。いずれの引例も、PDGFの変成二量体が野生型のPDGFに対してアンタゴニスト活性を持つことを教示していない。

PDGF単量体のアミノ酸鎖中の置換かPDGF-BBに対するアンタゴニストの生成をもたらすことが判明している。PDGF-BBは細胞の形質転換に関係するので、以下の開示で記載するように、アンタゴニストは治療の面と他の種々の環境において価値を持つ。

# 図面の簡単な説明

図1は、例で詳しく述べるペプチド16TのHPLC精製を示す。

図2は、αレセプタに結合する<sup>125</sup>I-PDGF-AAに対するペプチドの競合活性を示す。

図3A、3Bおよび3Cは、種々のリガンドのPDGFレセプタとの結合に対する種々のHPLC精製PDGF由来のペプチドの競合活性を示す。

図4は、<sup>125</sup>I-標識されたPDGF-AAのインターナリゼーションと分解に対する種々のPDGF由来のペプチドの阻害効果を示すデータを示す。

図5は、ペプチド16Tによるレセプタの二量化と自動加糖酸化の阻害を示す。

図6Aは、二量体PDGF-AAに対する還元剤ジチオトレイトール（「DTT」）の影響を示す。

図6Bは、二量体PDGFの還元後の単量体物質の溶解を示す。

図7Aは、タンパク質分解、部分還元された単量体PDGF-AAから得られたHPLC情報を示す。

図7Bは、図7AのHPLC実験から分離したペプチドのアミノ酸配列を記載している。

図8Aおよび8Bは、[<sup>35</sup>S]-システインで標識した後の免疫沈降されたならし増地の分析を示す。

図9は、細胞成長と、<sup>125</sup>I-PDGF-Bとペプチドの連続希釈との結合に関する実験を示す。

図10Aおよび10Bは、PDGF B誘導体を使用したSDS-PAGE免疫沈降の研究(10A)と、二重化に対する誘導体の影響(10B)を示す。

図11Aは、PDGF-AA 二量体形成の研究を示す。

図11Bは、単結合二量体のレセプター結合活性を示す。

図12は、従来技術と表示されているが、プラスミドpSV7dの制限地図である。

図13は、PDGF-Aの免疫沈降と、COS細胞での発現後の突然変異PDGF-Oを大体示す。

図14は、突然変異PDGF-OとPDGF-Aを使用した結合測定の結果を示す。

図15は、PDGF-OのDNAとの感染後のPDGF-B生成細胞の免疫沈降に関するデータを示す。

図16は、pSV7d-PDGF-O感染sis3T3細胞によるPDGF-Oベテロダイマーの生成を示す。

図17は、sis3T3 PDGF-O生成物質と非生成物質の形態を比較している。

図18は、sis3T3の増殖に対するPDGF-Oの影響についてのデータをグラフで示す。

図19は、sis3T3細胞のコロニー形成に対するPDGF-Oの影響を示す。

#### 好適実施例の詳細な説明

##### 例1

レセプター結合をテストするために、ヒト包皮繊維芽細胞系AG1518(ヒト突然変異細胞委託機関から得た)の培養を、10%新生仔ウシ血清を含むHAMF

-12培

地で密集成長させた。PDGF-βレセプター結合の分析に使用される細胞は、1mg/mlのウシ血清アルブミン(BSA)と50ng/mlのPDGF-AAで補足されたHAMF-12培地の0.5ml/ウェルで37℃で60分間、前保持(プレインキュベイト)した。この組合せは、クレソニン-ウエルシュ他、ジェイ・バイオール・ケム264:1742~1747(1989)(Claesson-Welsh et al., J. Biol. Chem. 264: 1742-1747(1989))に示されているように、PDGF-αレセプターをダウンレギュレートする。

氷冷却結合緩衝液(0.9mMのCaCl<sub>2</sub>、0.49mMのMgSO<sub>4</sub>および1mg/mlのBSAを含んだ炭酸塩緩衝液)で細胞を洗って、レセプター結合分析に調製した。そして、異なる濃度(0~100μg/ml)の合成ペプチド(下配の表1に記載)と、1ウェルにつき0.5mlの結合緩衝液で、細胞を氷上で90分間、保持(インキュベイト)した。その後、<sup>125</sup>I標識PDGF-A、PDGF-BまたはEGFを加えた。標識されたリガンドを加え、0℃で60分間保持してから、氷冷却結合緩衝液で細胞を5回洗った。洗われた細胞を、溶解緩衝液(1%トリトンX-100、10%グリセロール、20mMトリスHCl、pH7.5)中で常温で60

分間溶解させた。ガンマカウンタで可溶性放射能を測定した。非標識リガンドを使用して、合成ペプチドの結合活性を標準曲線と比較した。

使用したペプチドはすべて、PDGF-Bのアミノ酸配列由来のものであった。アミノ酸名称は、ベッツォルツ他、ネイチャー320:695~699(1986)(Bethholtz et al., Nature 320: 695-699(1986))に記載されたものに86)もとづくもので、その開示を否定することによって本書に取り入れる。この論文は、PDGFのA鎖およびB鎖の両方の完全な非プロセッティングを示している。本書で数字を使用するとき(例えば「Cys 123」)はその単量体の完全な非プロセッティングを指すが、例えば「第2のシステイン」というように、システイン基の位置づけに順番を使用するときはプロセッティングを指すことを理解されたい。プロセッティングのA鎖の最初のアミノ酸はセリンで、非プロセッティングの位置8に在する。PDGF-B鎖の最初のアミノ酸もセリンで、非プロセッティングの位置8

2に存在する。非プロセスPDGF-Aは211個のアミノ酸の長さで、非プロセスPDGF-Bは241個のアミノ酸の長さである。

」は<30μM、「++」は30~60μM、「+」は60~150μM、そして「-」は>150μMを意味する。

表 1

ペプチド番号	合成ペプチド	
	PDGF-B	Aアミノ酸配列の部分

1	155-180, 但し178のCysはSerに変化
2	141-163
3	142-163
4	142-179
5	111-140, 但し124、133及び134のCysはSerに変化
6	116-127
7	116-127及び147-163
8	121-127及び147-163
9	116-127及び147-157
10	116-127及び147-163
11	116-124及び152-163
12	116-123及び152-163
13	116-123及び153-161
14	116-121及び153-161
15	116-119及び154-162
16	116-121及び157-163
17	107-127及び152-163
18	98-106及び116-127及び152-163
*19T	112-121及び157-163
*16	116-121及び157-163
*16T	116-121及び157-163 但しトリプトファンがチロニンを置換
*16NPS	116-121及び157-163, 但しトリプトファンがニトロフェニルアラニンを置換
*20	Glu Ala Phe Ile Lys Trp Leu Val Arg Asn Lys Val Pro
*20T	Glu Ala Phe Ile Lys Trp Leu Val Arg Asn Lys Val Pro, 但しトリプトファンがチロニンを置換

表1で、\*印は均一ペプチドの使用を意味する。それ以外は粗ペプチドが使用された。均一ペプチドと粗ペプチドの説明は以下で行う。

PDGF-Bの結合を阻害するペプチドの能力を、結合を50%低下させるためにどれだけのペプチドが必要か、ということによって測定した。表2で、「+++

表 2

ペプチド	結合に関してPDGF-Bと競合する能力	
	阻害活性	

1	-
2	-
3	-
4	++
5	+
6	+
7	+++
8	-
9	+++
10	++
11	+++
12	+
13	+
14	+
15	-
16	+++
17	+++
18	+++
*19T	+++
*16	-
*16T	+++
*16NPS	+++
*20	-
*20T	-

PDGF-Bに対する阻害の結果のみを示すが、PDGF-Aを使用しても同様な結果が得られた。

テストしたペプチドはすべて、PDGF-Bのアミノ酸97~180 (Cys-Cys)の部分に由来するもので、それはこの部分が分子の全生物学的活性を及ぼすに十分であると判明しているからである。(キング他、ブロック・ナトル・アカド・サイ・USA 82: 5295~5299 (1985) (King et al



その目的で、0.1%トリフル

オロ酢酸中の10~90%アセトニトリルの30分勾配を使用したVydac C18カラム(10x250mm)による逆相HPLCでペプチド16を精製した。サンドクズスト他、マス・スペクトロメトリ・レブ4:421~460(1985)。85)(Sandqvist et al., Mass Spectrometry Rev. 4: 421-460(1985))に従って、<sup>232</sup>Cfプラズマ脱着質量分析を使用して、ペプチドを特定し、分析した。そして、上記方法と質量分析で、HPLCからの各成分を分析した。意外なことに、ペプチド16の予期された分子質量を持った成分(表1および2の「16\*」)は、他のHPLC成分と比べて非常に低い活性を示した。ペプチド16より大きい122Daの分子質量の成分はより高い活性を示した。HPLC研究の分析により、チオアニソールが質量分析中にペプチド16のトリプトファンに結合しているという結論に至った。「16T」と呼ぶこのペプチドをより大量の得るため、より濃度の高いチオアニソールを保護解除段階で使用した。HPLC精製が図1に、そして種々のHPLC画分の結合活性が図2に示されている。次の表3はHPLCで決定したイオンの構造と質量の案を示す。

., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 5295-5299(1985))。

共直鎖状ペプチド1~6は、限られた阻害性のみを生じた。ペプチド4および5で得られる弱い阻害性は、配列のこれらの2つの部分の組合せがより効果的かも知れないことを示唆した。

29個のアミノ酸の長さで、12のN末端部分と17のC末端アミノ酸を含むペプチド7は、両レセプタに効率的に結合し、約6μMで50%の結合であった。この結果にかんがみ、関連エピトープを定めるために追加のペプチドを調製しテストした。ペプチド7の5個の最N末端アミノ酸が欠失したペプチド8はほとんど無活性で、6個の最C末端アミノ酸が欠失したペプチド9も同様であった。エピトープ結合のN末端側の3個のアミノ酸を除去したり(ペプチド10)、5個のC末端アミノ酸を除去すると(ペプチド11)、活性に対する影響が低下した。

2つのエピトープをさらに定義する試みは、ペプチド16の生成をもたらし、そのアミノ酸配列は

ANFLVWEIVRKKP

で、レセプタ結合活性をほとんど維持していた。しかし、2個の接合アミノ酸を取り去ると、分析できない不溶性ペプチドを生じた。NH<sub>2</sub>末端のエクステンション(拡張、ペプチド17~19)は活性を高めた。これらの実験から得られた結論は、13個のアミノ酸長さで、PDGFのB鎖の2部分を含むペプチドが、αおよびβレセプタに対するPDGF-AAおよびPDGF-BBの結合の効果的な結合物質だということである。

例2

例1の実験で使用したペプチドは、ペプチドシンセサイザーを使用したt-Boc化学で調製した。それらは、8%アニソールと4%メチル酸化エチルをスクベンジャーとして、0℃で60分間HFでの保持によって高分子支持体から切断した。トリプトファンを含むペプチドには3%チオアニソールを加えた。これらの調製物は粗製のものである。

ペプチド16で得られた興味深い結果は、精製物を使用した実験を提起した。

表3 ペプチド16のHPLC精製(図2B)の間に収集された画分の質量分析

画分	観測 m/z	分子案 (括弧内は m/z 予測値)
1	1452.6	M-Phe (1453.7)
	1581.6	M-Nitril (1582.9)
2	1601.0	M (1600.9)
	1581.5	M-Nitril (1582.9)
3	1599.2	M (1600.9)
4	1485.8	M-Asn (1486.8)
	1599.2	M (1600.9)
5	1644.9	
	1644.8	
	1560.0	
6	1574.0	M122-Phe (1575.9)
	1654.9	M + tBu (1657.0)
7	1708.1	M122-Nitril (1705.8)
8	1721.2	M122 (1723.1)
9	1754.0	M + Tos (1755.1)
	1722.8	M122 (1723.1)
	1689.9	M + OBzl (1691.0)
	1651.1	M122 - Ala (1652.0)
	1594.2	M122 - Lys/Glu (1594.1/1593.9)
10	1724.7	M122 (1723.1)
	1608.5	M122 - Asn (1609.0)
11	1763.9	M122-Nitril + tBu (1761.2)
12	1778.1	M122 + tBu (1779.2)
13	1778.1	M122 + tBu (1779.2)
14	1846.9	M122 + Clz (1847.6)
	1875.8	M122 + Tos (1877.3)
15	1847.0	M122 + Clz (1847.6)

略字: M、ペプチド16; M122、ペプチド16T; Nitril、脱水アスパラギン; Bu、第三ブチル; Tos、4-トルエンデンスルホニル; O Bz1、ベンジルエステル; Cl-z、2-クロロベンジルオキシカルボニル

例3

トリプトファンの変成が活性を可能にするという仮定をテストするために、ト

リプトファンと反応することが知られている2-ニトロフェニル-スルフェニルクロライド(NPS-C1)で保持した(スコファオン他、バイオケム7:971~979(1968)(Scoffone et al., Biochem. 7: 971-979(1968)を参照) )。その結果得られた誘導体「16NPS」も、ペプチド16と比較して、アンタゴニストとしてより高い活性を持っていた。

図3A、3Bおよび3Cに示す比較実験で、15 I-PDGF-AAと15 PDGF-BB (αおよびβレセプタ)の両者に対するペプチド16および16Tの結合活性をテストした。図は、PDGF-AAとPDGF-BBの両方に対し、ペプチド16はわずかな効果しかないが、16Tが有効な結合物質であったことを示している。15 I-PDGF-AAと15 I-PDGF-BB

に結合するレセプタに対し、それぞれ44μg/ml(26μM)と57μg/ml(33μM)のペプチド16Tが50%の結合を与えた。

任意のアミノ酸配列を持ったペプチド、つまりペプチド20および20Tで、後者はトリプトファンにチオアニソールの変成を担持したもの、を使用して対照を行った。図2A、2Bおよび2Cに示すように、ペプチドは結合に結合しなかった。これらの実験から得るべき結論は、アミノ酸配列とトリプトファン変成が結合作用に重要であるということである。

図3Cは、ペプチド16、16T、20および20Tのいずれもが、EGFレセプタに対する15 I-EGFの結合に結合しないことを示す。従って、ペプチド16TはPDGFレセプタ結合に対して特異的である。

例4

生体内でのPDGF活性に対するアンタゴニストとしてのペプチド16Tの考え得る役割を調べた。言及によって開示を本書に取り入れるベツシヨルツ他、ジエイ・セル・フィジヨル118:203~210(1984)(Betsholtz et al., J. Cell Physiol 118: 203-210(1984))の方法に従って、種々のペプチドの存在下での、

ヒトの繊維芽細胞による[3H]チミジンの組込みを調べた。表IVは、PDG

F-BBとEGFが繊維芽細胞への<sup>3</sup>H]チミジンの組込みを、それぞれ4倍と5倍に刺激したことを示す。PDGF-BBによる刺激の方が弱かったが、これはニスラー他、セル52:791~799(1988)(Nisler et al., Cell 152:791-799(1988))によって得られた結果と一致した。ペプチド16および16TはPDGF-AAおよびPDGF-BB誘導の分裂促進を確かに阻害したが、EGF誘導の分裂促進も阻害した。このことは、ペプチド16および16Tがレセプタに対する競合のレベルのみで作用したのではなく、別のメカニズムも関与していることを示す。ペプチド20、つまり対照はリガンドの刺激による<sup>3</sup>H]チミジンの組込みにわずかな影響を示し、一方、ペプチド20Tはある程度の非特異的阻害活性を示した。ペプチド16Tはペプチド16より効率的で、<sup>3</sup>H]チミジンのバックグラウンド組込みを大幅に低下させた。

表 4 リガンドの刺激による<sup>3</sup>H]チミジンのヒト包皮繊維芽細胞への組込みに対するペプチド16、16T、20および20Tの影響。数字は複製の平均を表す。

ペプチド	刺激用のリガンド			
	制 制	PDGF-AA	PDGF-BB	EGF
	(cpm)	(cpm)	(cpm)	(cpm)
制 制	483	677	1918	2591
ペプチド16	241	242	281	216
ペプチド20	348	535	1541	2059
ペプチド16T	46	90	102	119
ペプチド20T	456	489	836	515

例5

無脈の細胞に対するペプチドの影響を調べるためにさらに実験を行って、特にリガンド分解の阻害を調べた。

そのために、12ウエル皿の密集したヒトの包皮繊維芽細胞を、1mg/mlのBSAで補足された1.0mlのハムF-12培地で一度洗った。上記のよう

に、後で<sup>125</sup>I-PDGF-BB分解のテストに使用する細胞は、αレセプタをダウンレギュレートするためにPDGF-AAで前保持した。そして、1mg/mlのBSAを含む0.5ml/ウエルのハムF-12培地で、それぞれ異なる濃度のペプチド16、16T、20および20Tと<sup>125</sup>I標識PDGF-AA、PDGF-BBまたはEGFとともに細胞を保持した。その混合物を37℃で4時間保持し、保持培地を除去し、10%の最終濃度のトリクロ酢酸で沈降させた。細胞培地でのトリクロ酢酸の不沈降放射能量をリガンド分解の野面積とした。つまり、それは取り込まれ、分解され、自由な<sup>125</sup>I-Tyr、または低分子量断片として培地内へ放出されたリガンドを表す。このパラメータは37℃で4時間保持した後決定した。

図4は、すべてのペプチドが<sup>125</sup>I-PDGF-AA分解に対してある程度の阻害活性を示し、ペプチド16Tが最も有効であることを示す。PDGF-BB分解についての効果はより低く、ペプチド16Tが最も強力であった。すべてのペプチドが<sup>125</sup>I-EGF分解を阻害したが、すべてのペプチドも同様な活性を示した。

これらの結果は、ペプチド16Tが細胞に影響し、それがPDGFレセプタレベルでの特異的阻害と、PDGF特異的でない細胞内での結果の組合せであることを示し

ている。

例6

上記結果は、ペプチド16Tがαおよびβレセプタの両者と相互作用することを示している。レセプタに対するPDGFの結合がレセプタの取込みとダウンレギュレーションを生じるので、PDGFとペプチド16Tの相互作用がレセプタの取込みとダウンレギュレーションを起こしたのが調べた。これをテストするため、上記の密集細胞を37℃の結合緩衝液で一度洗ってから、異なる濃度の合成ペプチド(1mg/mlのBSAを含む0.5mlのPBS)と保持した。その後、細胞を37℃で4時間保持してから、20mMの酢酸ナトリウム、150m

Mの塩化ナトリウム、0.2%BSAからなり、酢酸でpH3.7に調整した1mlの水冷却緩衝液で洗い、そして、細胞を緩衝液中の水上で10分間保持し、1mlのpH7.4の結合緩衝液で二度洗った。細胞表面のPDGFRレセプターの数を、0.5mlの結合緩衝液での<sup>125</sup>I-PDGF-BB(-50,000cpm)と水上で60分間の保持、洗浄、溶解および細胞結合放射能の測定によって評価した。

結果は否定的であった。つまり、ペプチド16Tは

PDGF- $\alpha$ および $\beta$ レセプタをダウンレギュレートしなかった。

#### 例7

ペプチド16TのPDGFRレセプタとの相互作用がアゴニスト的かアンタゴニスト的かを調べる研究を行った。これは無極の細胞におけるPDGFおよびEGFRレセプタの二量化と自動加磷酸化の研究を含んだ。

密集したヒトの包皮繊維芽細胞を使用した(25cm<sup>2</sup>皿の培養)。上記のように1mg/mlのBSAを加えた結合緩衝液で細胞を二度洗った。その後、水上で合成ペプチド16、16T、20および20Tのひとつと90分間保持した。そして、PDGF-BBまたはEGF(300ng/ml)を加えてから、さらに60分間保持した。そして、基本的にエリクソン他、グロウスファクターズ6:1~14(1992)(Eriksson et al., Growth Factors 6: 1-14(1992))に従って、二量化の定量を行った。基本的には、溶解緩衝液(0.5%トリトンX-100、0.5%デオキシコレート、20 $\mu$ MのpH7.4のヘプス、150mMの塩化ナトリウム、10mMのEDTA、1mMのPMSF(フェニルメチルスルホニルフロリド)、1%トラシロール(アプロチ

ニン)、100 $\mu$ Mのオルトバンダト(ortovandato)、ホスファターゼ阻害剤)中の1mMのBS<sup>3</sup>(ビス(スルホスタクシニミジル)スベレート)で、常温で20分間レセプタを架橋させた。70mMの塩化メチルアンモニウムを10分間加えて、架橋をクエンチングした。そして、サンブルを4%スラブゲル中のSDS

ゲル電気泳動に付してから、ニトロセルロース膜へエレクトロブロットティングし

た。遮断された膜を、親和精製されたホスホチロシン抗体(エグ他、ジェイ・バイオル・ケム259:1145~1152(1984))(Etk et al., J. Biol. Chem. 259: 1145-1152(1984))で2時間保持してから3回洗った。そして、プロットを、ペルオキシダーゼ複合、親和精製されたブタのアンチラビッド16G免疫グロブリンで、45分間保持した。さらに3回洗ってから、複合体をEGF現象システムで可溶化した。

図5に示す結果は、PDGFとEGFが両方ともレセプタの自動加磷酸化を誘発したことを示している。架橋後、大半の自動加磷酸化レセプタが、恐らく二量体を表すばやけた2倍サイズ部分(図5の角かっこ)として検出された。

ペプチド16Tを使用した場合、PDGFR誘発の自動加磷酸化と二量化は約5%阻害された。EGF誘発の

活性には影響がなかった。対照ペプチド20Tはなんらの影響も示さなかった。これらの結果は、ペプチド16Tがアゴニストではなく、アンタゴニストであることを示している。

#### 例8

自動加磷酸化と二量化に関連する実験をさらに行った。これらは部分的に精製されたPDGF- $\beta$ レセプタを使用したもので、より定量的である。

トリトンX-100で可溶化したブタの子宮膜を、レンストランド他、ジェイ・バイオル・ケム262:2929~2932(1987)(Roemstrand et al., J. Biol. Chem. 262: 2929-2932(1987))のモノクローマトグラフィのステップまで精製したものを、PDGF- $\beta$ レセプタを調製し、そこに記載された自動加磷酸化の定量を行った。

約100ngのレセプタを、異なる濃度のペプチド16Tまたはペプチド20と、0℃で5分間保持した。PDGF-BB(100ng)を加えて、さらに15分間保持した。保持混合物は全体量が40 $\mu$ lで、最終濃度として、0.1%トリトンX-100、5%グリセロール、0.5mMのEGTA、0.5mMのジチオトレ

イソール、20 mMのpH 7.4のヘブス、180 mMの塩化ナトリウム、3 mMの塩化マンガン、そして1 mg/mlのBSAを含んでいた。4  $\mu$  lの150  $\mu$  M [ $^{32}$ P] ATP (5 x 10<sup>5</sup> cpmの放射能を含む)を加え、さらに0℃で10分間保持した。5  $\mu$  lの15 mM非細粒ATPと5  $\mu$  lの40 mMフェニルフォスフェートを加えて、放射能の組込みを終了させた。0.5 mMのDSS (12.5 mM、ジメチルスルホキシド中)と、常温で30分間保持することによって、サンプルを架橋させた。50 mMの塩化メチルアンモニウムと20 mMのpH 7.4のヘブスを加えて、架橋反応を止めた。

ペプチドの存在しない状況で、図5に示すように、PDGFはその180 KDaのレセプタと130 KDa分解生成物の自動加糖酸化を誘発した。共有架橋後、大半の自動加糖酸化物は約350 KDaで二重バンドとして見られた。

ペプチド16 Tが存在すると、濃度が増加するにつれて、二重化と自動加糖酸化の両方が減少した。5  $\mu$  gのペプチドで、ほぼ完全な阻害が得られた。対照ペプチド20は20  $\mu$  gまでの濃度で影響を示さなかった。ペプチド16は中間的な影響を持ち、20  $\mu$  gで完全に阻害

した。これらの結果は、上配リガンド結合の阻害の研究で得られたものと対応する。

#### 例 9

各PDGF鎖が8個のシステイン残基を含むことを以前の研究が示しているが、遊離SH基は見つかっていない。(クレンソーン・ウエルシュ他、プロク・ナトリ・アカド・サイ・USA 86: 4917~4921 (1989) (Claesson-Welsh et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 4917-4921 (1989))。PDGFは多価鎖数の鎖間ジスルフィド架橋、恐らく2個の鎖間架橋と、各サブユニットに3個の鎖間架橋を含むのではないかと考えられた。鎖間ジスルフィド架橋は鎖間ジスルフィド結合より還元されやすいと思われた。鎖間結合を特定するために、部分還元法を採用した。

組換えPDGF-AA最スプライズ変異の部分標本を、異なる濃度のジチオレイトール (「DTT」) と、常温で2時間保持した。そして、これらのサンプル

ルを、非還元条件を使用して、SDSゲル電気泳動でアルキル化し、分析した。その後で銀染色を行った。

図6Aは、DDTの濃度の増加につれて、PDGF-AAが30 KDaから17 KDaへ徐々にシフトしたこ

と、二重体から単量体へシフト、を示している。3 mMのDTTで、ほとんどすべてのPDGFが単量体として現れたが、その物質は完全に還元されたPDGFよりゆっくり移動し、鎖内結合が残っていることを示唆した。

この実験は、鎖間結合が鎖内結合より還元されやすいことを確認し、この方法の使用により、関係する特定の残基を特定できることを示唆している。

#### 例 10

例9の実験は準備的スケールで行われた。90  $\mu$  gの組換え最スプライズPDGF-AAが220  $\mu$  lの0.36 MトリスHCl、pH 8.2中で、3 mMのDTTで、20℃で2時間処理された。これにより鎖間SH結合が露出し、それを同じ溶液中で15分間9 mMのヨード酢酸と反応させて基をアルキル化した。アルキル化した単量体を、15 ml/hの流量の、6 Mの尿素、0.3 Mの塩化ナトリウムおよび1 Mの酢酸中で、スペローズ12 (1 x 30 cm) のゲルクロマトグラフィーで分離した。図6Bに示すように、2つのピークが露出した。プローベル他、ジェイ・セル・バイオ67: 835-851 (1975) (Blumberg et al., J. Cell Biol. 67: 835-851 (1975)) に従って、SDSゲル電気泳動で断片

を分析し、その後銀染色を行った。そのゲル研究は、2つのHPLC断片が単量体と二重体であることを示した。単量体物質を、細孔ブラウンリー・アクアポアC1カラム (narrow bore Brownlee Aquapore C1 column) を使用した逆相HPLCで脱塩することによって分離した。その物質を二分した。一方をレセプタ結合定量に使用し、他方を完全に還元した。これら2つの断片についての実験を以下で説明するが、完全還元に関する方を最初に述べる。レセプタ結合は、下記の例14のプロトコールを使用して行った。

例11

部分還元された単量体PDGF-Aを、4MのグアニジンHCl、1MのトリスHCl、pH8.0、および10mMのEDTA中の20mMのDTTで、27℃で2時間かけて完全に還元した。これで単量が完全に還元され、それを4-ビニルピリジンで処理した(常温で2時間の保持)。還元された単量体を上記のように脱塩し、乾燥させた。4-ビニルピリジンでの処理はシステイン残基をビリジルエチル化し、254nmで可視化した。

還元物質を、200μlの2M尿素と0.1M重炭酸

アンモニウム中で、37℃で15時間、1/50(w/w)の酵素/基質比のClu-Cプロテアーゼで加水分解した。反応時間の終了時に、その混合物をブランク・アキュアボAC4(2.1x30mm)細孔カラムに入れ、100μl/分の流量のn-プロパノール(0~27%、超60分)0.16%トリフルオロ酢酸の直線勾配で断片を溶出させた。フォトダイオードアレー検出器で溶出物を監視し、200~300nm間でスベクトルデータを収集した。

これらのHPLC断片を、ポリアレン処理したガラスファイバースク上で乾燥させ、周知のエドマン分解を行った。HPLC情報を図7Aに示す。システイン残基を含んでいた配列を図7B(つまり、配列SP1、2、3および4)と、配列認識番号(SEQIDNOS)に示す:

図7Bで、「#」はカルボキシメチルシステインで、「@」はビリジルエチルシステインである。

鎖間ジスルフィド結合に関係するこれらのシステイン残基は、ヨード酢酸の作用で、カルボキシメチルシステインとして現れるはずで、一方、鎖内結合形成システインはビリジルエチルシステインとして現れるはずである。これらの結果は、

、PDGF-A単量体の第2および第4

システイン残基が鎖間ジスルフィド結合を形成することを示している。

例12

例11の結果をさらに調べるために、Cys123とCys132がセリンに

なるよう、PDGF分子のcDNA配列コーディングを変異させた。これを行うために、PDGF-Aの短スプライス形のcDNAを使用した(ベツショルツ他、ネイチャー320:695~699(1986))。クンケル他、メス・エンジモル154:367~38e320:695-699(1986)。Kunkel et al., Meth. Enzymol 154: 367-382(1987))に従って、残基の一方または両方に対応するコドンを作り、pSV Ser2、pSV Ser4、およびpSV monoAを得た。ウラシルを含むテンプレートコード化する野生型PDGF-Aも生成した。同様に、B鎖cDNAの対応するコドン(PDGF Bストップ変異のCys124、Cys133)を変異させてpSV monoBを生じるとともに、コドン191を停止コドンに変換し、可溶性成分を得た(イストマン他、セル・レグ2:503~512)(Oestman et al., Cell Reg. 2: 503-512)。

ベクターpSV monoA、pSVA Ser2、およびpSV Ser4をつくるために、イストマン他、ジェイ・バイオ・ケム263:16202~16208(1988)(Oestman et al., J. Bio. Chem. 263: 16202-16208(1988))に教示されたように、変異断片をベクターpSV-PDGF-A 102A(pSVA)のEcoRI/Bal I部位にクローン化し、野生型断片を切除した。プラスミドpSV7dのEcoRI部位にクローン化することによって、構造pSV monoBを生成した。このプラスミドは周知で、その構造はトルエット他、DNA4(8):333~349(1985)(Truett et al., DNA 4(8): 333-349(1985))の図2に示されている。それは図12としても示されている。

例13

pVSAおよびpSVBストップを含む例12の構造を、イストマン他、セル・レグ2:503~512(1991)(Oestman et al., Cell Reg. 2: 503-512(1991))に従って、60mm培養皿の20μgのプラスミドDNAと0.5~1x106の細胞を使用して、COS細胞を感染させた。感染後2日目に代謝標識を行った。0.1mCi [<sup>35</sup>S]システイン/ml、10%

の透析したガン胎児血清、および抗生物質で補足した1.5mlの無システイン MCD B104 培地で一晚細胞を増殖させることで、これを達成した。標識後、培地を収集し、遠心分離で細胞かすを取り除いた。細胞をPBSで一度洗い、かき集めて、0.5mlの0.5M塩化ナトリウム、20mMトリスHCl、pH 7.5、0.5%トリトンX-100%、1%アブロチニンおよび1mMのPM SFで溶解した。細胞溶解物を10,000gで15分間遠心分離にかけ、上澄みに対して、PDGF-AAの抗血清を使用した免疫沈降を行った。基本的に、15μlの正常なウサギ血清で4℃で1時間保持することによって、サンプルを予備清浄化した後、60μlのPBS中の50%タンパク質Aセファロースのストラリーを加えた。これを4℃で30分間保持し、遠心分離でビーズを取り除いた。その後、15μlの抗PDGFAAまたは抗PDGFB-Bを加えてから、4℃で2時間保持した。さらに、再びタンパク質Aセファロース（上記）で保持した。そして、ビーズを、0.5Mの塩化ナトリウム、20mMのトリス、pH 7.5、5mg/mlのBSA、1%トリトンX-100および0.1%SDSで5回、20mMのトリスHCl、pH7.5で1回洗った。200μlの非還元サンプル緩衝液を加え、95℃

で3分間の保持によって、免疫複合体を溶解した。DTT（最終濃度10mM）を加え、95℃で2分間の保持によって、溶解物の半分を還元した。50mMの最終濃度のヨードアセトアミドでアルキル化を行った。12~18%ポリアクリルアミドゲルとボルログラフィを使用したDSゲル電気泳動で、サンプルを分析した。

結果を図8Aおよび8Bに示す。図8Aは、<sup>[35S]</sup>システイン標識された細胞からのならし培地で免疫沈降されたとき、単量体の形のみが見いだされたことを示す。還元条件下で分析すると、PDGF monomeric Aがゲル中でシフトしたが、これは細胞内ジスルフィド結合がゲル中でシフトしたことを示し、細胞内ジスルフィド結合が存在することを示す。また、抗野生型PDGF-AA抗血清はmonomeric Aを認識し、PDGF monomeric Aの位置が二量体の2つの鎖と同様であるという理論を裏付けている。

平行変異体であるPDGF monomeric Bは、図8Bから理解されるように、同じ分析のパターンを示した。

#### 例1.4

以下の実験は、例1.3に従って生成した超替えタンパク質を使用したレセプタ結合定量に関するものである。

超替えタンパク質の場合、感染から36時間後に、培地を1.5mlの無血清培地に変え、48時間培養を続けた。そして、培地を細孔逆相C4HPLCから（2.1x30mm）へ加えて脱塩と濃縮を行った。カラムを0.1%トリフルオロ酢酸で洗い、保存物質を0.1%トリフルオロ酢酸のアセトニトリルで溶離させた。蒸発後、サンプルをPBSの当初量の1/10で溶解し、PDGF-αおよびβに対する結合を調べた。この研究は、連続希釈と、AG-1518細胞との結合に関してis-1-PDGF-AAおよびis-2-PDGF-BBと結合する能力を分析することによって行なった。細胞をフアルコン24ウェルプレート（Falcon 24-well plates）で密集増殖させてから、結合緩衝液（1mg/mlのBSA、0.9mMのCaCl<sub>2</sub>、0.5mMのMgCl<sub>2</sub>を含むPBS）で1回洗った。図9に示す異なる希釈液を含んだ200μlの結合緩衝液、つまり標識のための公知の量のPDGF-AAおよびPDGF-BB中で、0℃で2時間保持した。結合緩衝液で細胞を2回洗ってから、200μlの結合緩衝液中の放射線標識PDGF-AAまたはPDGF-BB（0.5~2ng; 15,000~30,000cpm）を加えた。これを0℃で1時間保持してから、細胞を結合緩衝液で5回洗い、20μlの

20mMトリスHCl、pH7.5、1%トリトンX-100および10%グリセロール中で室温で20分間溶解させた。ガンマカウンタで可溶性<sup>125</sup>I放射能を測定した。

βレセプタ定量を行う場合、上記の前変失（prior depletion）も使用した。結果は、図9に示すように、monomeric Bが比較的良好に結合したことを示す。検出できる程度にαレセプタに結合しなかったPDGF monomeric Bのデータは示し

259:1145-11152(1984))で、40℃で2時間保持した。免疫複合体を60μlのPBS中の50%タンパク質Aセファローズのスラリーで沈降させ、ビーズを、溶解緩衝液で3回、20mMのトリスHCl、pH7.5、0.5Mの塩化ナトリウム、1%緩衝液で2回、20mMのトリスHCl、pH7.5、0.5Mの塩化ナトリウム、1%トリトンX-100で2回、そして蒸留水で1回洗った。4%SDS、0.2mMのトリスHCl、pH8.8、0.5Mのシュエーグロース、5mMのEDTA、0.01%プロモフェノールブルーおよび2%メルカプトエタノールを含む100μlのサンプリング緩衝液を加えて免疫複合体を溶離した。7%アクリルアミドゲルとフルオログラフィを使用して、SDSゲル電気泳動で免疫複合体を分析した。

図10Aおよび10Bはこれらの結果を示す。図10Aで、SDSゲル電気泳動を使用した免疫沈降物の分析が、pSVB停止とpSVmonoBの両方が自動加焼化を刺激したことを示している。PDGF-monoBがレセプタの二量化をもたらしたか否かを判定するために、

βレセプタ発現PAE細胞を[<sup>35</sup>S]メチオニンで標識し、関連構造のいずれかに感染させたCOS細胞からの濃縮ならし地で刺激した。これらの実験で、pSVB停止、pSVmonoBに感染させたCOS細胞または模擬感染細胞からの濃縮ならし地地1mlのポーションで、4℃で90分間、標識されたPAE細胞を保持した。細胞をPBSで1回洗い、20μMのpH7.4のヘベス、10mMの塩化ナトリウム、0.5%ノニデト(Nontidet)P40、10%グリセロール、1mMのPMSFおよび1%アプロチニンを含む可溶性緩衝液中で、4℃で20分間溶解させた後、遠心分離槽で(10,000g、30分間)を行った。1mMのBS<sup>3</sup>で、常温で30分間架橋を行った。50mMのトリスHCl、pH7.5中で、常温で10分間の保持で反応を止めた。免疫沈降と分析は上記の通りである。図10Bに示すように、PDGFmonoBとPDGF-BBの両方が二量化を引き起こした。

# 例16

第2および第4シズテイン間の瞬間ジスルフィド結合の配座を判定するために

でない。  
例15  
PDGFレセプタに対する単量体PDGFの結合がゴニストまたはアンタゴニストの結果を生じたかを判断することが重要であった。従って、自動加焼化定量化レセプタを活性化するPDGF-monoB分子の能力をテストした。pSVB停止、pSVmonoBに感染したCOS細胞の培養から、または模擬感染した細胞からのならし地地を、上記のように脱塩、濃縮した。レセプタ結合活性を調べるために、標準技法をしようして放射レセプタ定量化を行った。その後、pSVmonoBまたはpSVmonoB停止で感染させた細胞からの培

養を模擬感染細胞で、100ng/mlのレセプタ結合活性に調整した。25cm<sup>2</sup>の皿で増殖させたPAE細胞発現PDGFレセプタ(ウエスタマーカー)、ブロク・ナトル・アカド・サイ・USA87:128~132(1990)(Westermarck et al., Proc Natl. Acad. Sci. USA 87: 128-132(1990))を、0.1mg/mlのBSAと0.1mlの[<sup>35</sup>S]メチオニン/mlで補足された無血清およびメチオニンMCDB104培地で、37℃で3時間濃縮した。異なる濃度の1mlのならし地地で、4℃で30分間細胞を刺激した。100ng/mlの代替PDGF-BBを持つ1mlの模擬感染地地を使用して正の制御を設定した。細胞をPBSで1回洗い、20mMトリスHCl、pH7.5、150mM塩化ナトリウム、10mMのEDTA、0.5%デオキシコレート、0.5%トリトンX-100、30mMのピロリン酸、1%アプロチニンおよび1mMのPMSFの溶解緩衝液にかき入れてから、クリアランスのために10,000gで15分間遠心分離を行った。この溶解物の半分を、PDGF-βレセプタ由来のペプチドに対する5μlの抗血清(クレソナー・ウェルジュ他、ジェイ・バイオル・ケム264:1742~1747(1989)(Claesson-Welsh et al., J. Biol. Chem. 264: 1742-1747(1989))で、

他の半分をボス・カチロシンに対する1μlの抗血清(エク他、ジェイ・バイオル・ケム259:1145~1152(1984))(Ek et al., J. Biol. Chem



実験を行った。そのために、2つの新しい変異体、つまり第2残基をセリン残基に変異

させたPDGF A Ser 2と、第4残基をセリン残基に変異させたPDGF A Ser 4、を構成した。COS細胞をpSVA (A)、pSVA Ser 2、pSVA Ser 4、またはpSVA Ser 2及びpSVA Ser 4両方に感染させた。対応システイン残基間に鎖間結合が生じると(例えば第2システインから第2システイン、または第4システインから第4システイン)、pSVA Ser 2またはpSVA Ser 4のみに感染させた細胞は二量体を形成しない。実際、二量化は共感染細胞だけに発生するはずである。

細胞を<sup>[35S]</sup>システインで標識し、ならし培養または模擬感染COS細胞からの培養を、抗PDGF AA抗血清を使用して免疫沈降し、DTTを使用して、あるいは使用せずに、SDSゲル電気泳動で免疫沈降物を分析した後、フルオログラフィを行った。

図11Aは、共感染細胞にDTTが無い場合のみ二量体が検出され、架橋が生じたことを示す。このことから、第2および第4のシステイン残基がPDGF二量体で縦横にジスルフィド結合したと結論できる。

#### 例17

上記感染細胞の活性を調べるためにテストを行った。

pSVA、pSVA Ser 2、pSVA Ser 4、そしてpSVA Ser 2およびpSVA Ser 4感染細胞からのならし培養を、濃縮、脱塩し、αレゼプタとの結合をテストするためにpSVA Ser 2とpSVA Ser 4と組み合わせた。図11Bは、共感染細胞の存在状況でのみ結合が生じたことを示す。これらの実験は、単一の鎖間バンドを持つPDGF二量体が機能的に活性であることも証明する。

#### 例18

PDGFレセプタと結合しないが、正常の経道と二量化を受けるに野生型PDGFと十分類似するPDGF変異体を生成した。PDGF-Oと呼ぶ変異体を次

のように複製した。PDGF-A鎖の短スプライス形をコード化し、上記例12で言及したベクターpSV7d-PDGF-A (ベツショルツ他、ネイチャー320:695-699 (1986) (Betscholtz et al., Nature320: 695-699 (1986)) ; イストマン他、ジェイ・バイオ・ケム263:16202-16208 (1988) (Oestman et al., J. Bio. Chem. 263: 16202-16208 (1988)) も参照) を使用した。PDGF-Aの短スプライス変形をコード化する1.3キロベースのcDNAを周

知のベクターM13にクローン化した。その後、クンケル他、メス・エンジモル154:367-382 (1987) (Kunkel et al., Meth. Enzymol 154: 367-382 (1987)) に従って、クンケル他、メス (Kunkel et al., Meth.) に従って、突然変異誘発を行い、ケック他、サイエンス246:1309-1312 (1989) ; リュンダ他、サイエンス246:1306-1309 (1989) (Keck et al., Science 246: 1309-1312 (1989); Leung et al., Science 246: 1306-1309 (1989)) に記載されたように、アミノ酸156-162を内皮細胞マイトジェンVEGF/VPGに置換した。トルエット他、DNA:333-344 (1985) (Truett et al., DNA 4: 333-344 (1985)) に記載され、先行する例で言及したように、その変異DNAをベクターpSV7dにクローン化した。以下でpSV7d-PDGF-Oと呼ぶ生成された構造にたいして、配列が正しいことを検証するために、通常のDNA配列分析を行った。要約すると、生成された構造pSV7d-PDGF-Oは、アミノ酸156-162つまりEYV RKKPKPHQCGHに置換されたPDGF-Aの短スプライス変形をコード化した。この選択はいくつかの要因にもとづく。第一に、置換された配列は、PDGF-Bレセプタに結合することが示

されたPDGF-B鎖の2つの部位の一方と幾分オーバーラップする(イストマン他、ジェイ・バイオ・ケム266:10073-10077 (1991) (Oestman et al., J. Bio. Chem. 266: 10073-10077 (1991)))。第二に、その部位は親水性で、これは分子での表面露出を示唆する。最後に、PDGFとVEGF/V

P F間のシステイン残基が完全に保存されることが以前に観察されており、これは置換された配列がタンパク質構造全体に対して干渉しそうなことを示唆する。

#### 例 19

上記例 18 に記載したベクターの解凍後、その構造を真核細胞の感染に使用した。アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (American Type Culture Collection) から ATCC (CRL 1650) として入手可能な細胞系 COS-1 を、10%ウシ胎児血清と抗生物質で補足したダルベッコ (Dulbecco's) 最少必須培養地で培養した。イストマン社、セル・レグル 2: 503~512 (1991) で、細胞の 10 μg サンプルと 60mm の皿あたり 0.5~1 x 10<sup>6</sup> の細胞を使用する。Oestman et al., Cell Regul. 2: 503-512 (1991) の隣接カルシウム法で、細胞の 10 μg サンプルと 60mm の皿あたり 0.5~1 x 10<sup>6</sup> の細胞を使用する。細胞を感染させた。pSV7d-PDGF-A を

使用して平行培養も設定した。培地に [<sup>35</sup>S] システインを加え、すべての培養を 4 時間代謝標識した。

培養後、ならし培地を除去し、細胞を溶解した。培地と溶解物の両方に対して免疫沈降実験を行った。これらの実験では、以前に (ヘルディン他、エクスプレス、136: 255-261 (1981)) すべての PDGF-A イソ型を認識するとされたポリクロナル抗血清を使用した。免疫沈降を 4℃で一晩行った。免疫沈降物を回収するためにタンパク質 A セファローズ CL-4B を使用した。これらのビーズを沈降物含有物質とともに 45 分間保持した後、緩衝液 (1% トリトン X-100、20mM トリス HCl、pH 7.5、0.5M 塩化ナトリウム、5mg/ml の BSA、0.1% SDS) で 4 回、20mM トリス HCl、pH 7.5 で 1 回洗った。そして、ビーズを緩衝液 (4% SDS、0.2M トリス HCl、pH 8.8、0.5M ジュエクロロス、5mM の EDTA、0.01% プロモフェノールブルー) 中で 95℃で 4 分間加熱することによって、免疫複合体を溶解させた。一部のサンプルに対して、10mM のジチオトレイトールを使用して、95℃で 2 分間還元処理を行った後、50mM のヨードアセトアミドでアルキル

化を行った。

還元または非還元条件にかかわらず、すべてのサンプルに対して、14%ポリアクリルアミドを含むゲル中での SDS ゲル電気泳動処理を行った。ゲルを「アンプリファイ (Amplify)」に浸してから、ハイパーフィルム (Molecular Dynamics) に露光した。

図 13 に示す結果は、pSV7d-PDGF-O が、約 30kDa の分子量の分泌二量体に処理される分子を生成することを示す。以下 PDGF-OO (二量体) と呼ぶこの分子は、PDGF-AA と同程度の大きさである。その二量体は以下 PDGF-O と呼ぶ。

#### 例 20

PDGF-OO ホモ二量体の結合特性を調べた。そのために、感染細胞 (pSV7d-PDGF-O; pSV7d-PDGF-A) からのならし培地と細胞感染細胞を分析して、分泌生成物 PDGF-A レセプタとの結合で PDGF-A-A 結合するかを判定した。実験では、細胞系 AG1518、ヒト包皮癌細胞系、株代 10~25 (ヒューマン・ジェネティック・ミュータント・セル・レポソトリ、カムデン、ニュージャージー (Human Genetic Mutant Cell Repository, Camden, N.J.))

から入手) を使用した。細胞を 24 ウエルプレートで増殖させ、0.5ml の結合緩衝液 (1mg/ml の BSA、0.9mM の CaCl<sub>2</sub> および 0.5mM の MgCl<sub>2</sub> を含む PBS) で 1 回洗ってから、非標識 PDGF-AA (0~16 ng/ml)、(a) 標識感染細胞、(b) pSV7d-PDGF-A 感染細胞または (c) pSV7d-PDGF-O 感染細胞からの 24 時間ならし培地のひとつとともに、<sup>125</sup>I 標識 PDGF-AA (2ng/ml、47cpm/mg) で、0℃で 2 時間保持した。培養を氷冷却結合緩衝液で 4 回洗った。細胞を 31 放射能を、0.2ml の 1% トリトン X-100、20mM トリス HCl、pH 7.5、および 10% (v/v) グリセロール中で希釈して 30 分間保持して抽出した。標準ガンマカウンタで放射能を測定した。

図 14 に結果を示す。pSV7d-PDGF-A 感染細胞からの培地は約 15

0 ng/ml の PDGF-A-A 活性を含んでいたが、pSV7d-PDGF-O 感染細胞からの培地は顕著な活性が見られなかった。この実験は、PDGF-A 鎖のアミノ酸 156~162 の対応配列 VEGP/VPP による置換が PDGF  $\alpha$  レセプタに対する結合の喪失につながることを示している。

#### 例 2.1

ベックマン他、サイエンス 241: 1346~1349 (1988) (Beckman et al., Science 241: 1346-1349 (1988)) とフレミング他、ブロック・ナトル・アカト・サイ・USA 86: 8063~8067 (1989) (Fleming et al., Proc Natl. Acad. Sci. USA 86: 8063-8067 (1989)) による以前の研究は、NIH 3T3 細胞におけるヒト PDGF-B の発現が、内因性 PDGF レセプタの自己分泌活性化による細胞感染を生じることを示した。従って、PDGF-O 鎖の発現によって、レセプタと結合するが、レセプタの二量化を許さない PDGF-OBヘテロダイマーの形成で、形質転換表現型が復帰できるかを調べた。このテストに、PDGF-B 鎖を発現する NIH 3T3 細胞 (以下「sis 3T3」と呼ぶ) を使用した。その細胞に、上記 pSV7d-PDGF-O 構造と、ビュロマイシン抵抗の指標である pSV2pac を共感染した。ウエスタマーク他、ブロック・ナトル・アカト・サイ・USA 87: 128~132 (1990) (Westmark et al., Proc Natl. Acad. Sci. USA 87: 128-132 (1990)) のエレクトロポレーション法で、40  $\mu$ g の pSV7d-PDGF-O と 1  $\mu$ g の pSV2pac を使用して、細

胞を感染させた。48 時間後、培地に 0.8  $\mu$ g/ml のビュロマイシンを含めることにより細胞を選別した。耐性クローンは、0.5  $\mu$ g/ml のビュロマイシンと 400  $\mu$ g/ml のゲンチシンで補足した培地で培養した。

そして、上記の免疫沈降法を使用して、約 200 の耐性クローンについて PDGF-O 生成を分析した。

図 15 に示すように、対照細胞溶解物に 40 および 24 kDa の成分が検出され、培地には何も検出されなかった。ビュロマイシン耐性クローンの約半分が

、溶解物と培地の両方に約 30 kDa の新 PDGF 成分を持っていた。これは、いかなる公知の PDGF-B 本モ二量体とも一致しない。下記の研究で、それがヘテロダイマー PDGF-OB とされた。

#### 例 2.2

例 2.1 で報告した結果にかんがみ、PDGF イソ型特異的抗血清を使用して免疫沈降研究を行った。そのような物質は、例えばサイバーグ他、ジェイ・セル・サイ 97: 219~229 (1990) (Thyberg et al., J. Cell Sci. 97: 219-229 (1990)) に記載されている。加えて、PDGF-A のアミノ酸 156~169 に対応するペプ

チドに対する抗血清 (ハマチャール他、ジェイ・バイオル・ケム 263: 1649-3~16498 (1988) (Hamacher et al., J. Biol. Chem. 263: 16493-16498 (1988))) を使用した。免疫沈降のプロトコールは、ペプチド特異的抗血清の使用前に、sis 3T3 細胞の培地を、10 mM のジチオトレイトール (DTT) で、37℃ で 2 時間、50 mM のヨードアセトアミドで、中性 pH、室温で 0.5 時間処理した以外は、上記のものとまったく同じであった。

これらの結果を図 16 に示す。

3 つの細胞系に還元条件を使用して 30 kDa の物質 (いわゆる「C15」、「C111」および「C118」) を生成すると、抗 A および抗 B 抗血清は同様な結果を生じた。その沈降物は、PDGF-A のみを生成する細胞系、つまり細胞系 A172、のならば培地からの抗 A によって沈降した物質および抗 B 抗血清を使用して sis 3T3 から沈降した物質と同じ大きさであった。2 つの抗血清による認識は、30 kDa の物質が PDGF-OBヘテロダイマーであることを示唆している。

これらの実験は、PDGF-A-Bヘテロダイマーが形成される可能性を皆無にしたわけではないので、ペプチド 156~169 に対する抗血清について調べた。図示

しない結果において、抗血清は PDGF-A 鎖を結合するが、感染 COS 細胞に

よって生成されるPDGF-Oを結合しないことが判明した。抗血清をA172についてテストすると、16、17および23kDaの成分、つまりPDGF-Aの3つの形が見いだされた。クローン5、11および18からの培養地には、そのような形が検出されなかった。

この研究から引き出される結論は、抗AおよびB抗血清の両方が感染した3T3細胞中に配位する16、17および23kDaの成分がPDGF-OのcDNAの生成物であり、これらの生成物がそのような感染細胞におけるpDGF-OBヘテロダイマーである、ということである。

例2.3

sis3T3細胞がPDGF-Oを生成し、変異体がPDGF-Bと会合してPDGF-OBヘテロダイマーを生じることが判明したので、変異体がsis3T3細胞の公知の感染表現型に影響するか調べた。

PDGF-Oを生成した上記感染からの3つのクローン（以下「C11」、「C16」および「C119」と、その分子を生成した3つ（上記C15、C11およびC119）と比較した。

最初のパラメータに関して、図17でクローンを比較している。非生産者（C11、6、19）はスピンドル形で、縦横の成長パターンを示すが、その両方も形質転換細胞の典型である。これに対して、C15、11および18は、単層成長の整然としたパターンであった。

クローンの成長率を評価するために、10%ウシ胎児血清で14日間増殖したダルベッコス最少必須培養地（DMEM）で細胞を培養した。7日目に培養地を変えた。これらの実験のグラフを図18に示すが、これは重複実験の平均値を表している。PDGF-O生成物は7日目で成長が止まり、14日目までにPDGF-O生成細胞と比べて数が4倍減少した。各グループ内の3つのクローン間に大きな相違はなかった。

軟寒天でのコロニー形成は、10%FCSと0.3%低温ゲル化アガロースと

、同じ培養地の0.5mlの層の50g/mlのPDGF-BBあるいはそれ無しで、そして0.6%低温アガロースで補足された0.5mlのDMEM中で、12のウェル皿に5x10<sup>4</sup>細胞/mg

を塗布して調べた。皿を3週間監視した後、顕微鏡写真撮影し、細胞を数えた。細胞の計数値を下に表5に示す。さらに、図19は上記顕微鏡写真を示している。PDGF-Oネガティブのクローンは50,000個の細胞あたり87〜124のコロニーを形成したが、ポジティブのクローンはコロニーが見いだせなかった。PDGF-BBを加えると、PDGF-O生成細胞は、ネガティブの細胞と同レベルでコロニーを生成したが、そのコロニーはより小さいものであった。従って、PDGF-O発現が、軟寒天でコロニーを形成するsis3生成細胞の能力を阻害した、との結論に達する。PDGF-BBの存在状況でのコロニー形成は、コロニー形成の欠乏がPDGF刺激に対する応答性の全体的喪失によるものではないことを明示している。

表5 PDGF-Oポジティブおよびネガティブ sis3T3クローンの軟寒天でのコロニー形成

媒介	ポジティブ		ネガティブ	
	PDGF-Aクローン	PDGF-B	PDGF-Aクローン	PDGF-B
5	11	18	1	6
19				
媒介	0	1	0	98
PDGF-BB (50 µg/ml)	104	85	76	N.D.
			91	N.D.

数字は5x10<sup>4</sup>個の細胞当りのコロニーを表し、三通りの決定の平均で、1S.D. < 0.14。N.D. は不明を表す。

上記実験は、PDGF鎖由来の種々のペプチドと変成ペプチドがPDGF分子に対するアンタゴニストおよびアゴニストとして作用することを示している。好適なアンタゴニスト的ペプチドは、PDGF-B鎖の2つの部

位からのエピソードを含有する。そのようなペプチドはアミノ酸配列を持つが、その配列はいずれの野生型PDGF単量体にも見いだせない。そのようなペプチドの好適な科は、次の式で表すことができる。

Ala Asn Phe Leu Val X (Y) n  
Glu Ile Val Arg Lys Lys

Pro

ここで、Xはトリプトファンまたは変成トリプトファン、Yは任意のアミノ酸、nは0から35の整数である。特に好適なアンタゴニストは本書で「16」および「16T」と呼ぶペプチドで、それぞれ下記のアミノ酸配列を持つ。

Ala Asn Phe Leu Val Trp Glu Ile Val  
Arg Lys Lys Pro

そして

Ala Asn Phe Leu Val Xaa Glu Ile Val  
Arg Lys Lys Pro

ここで、Xaaはチオアニン-アル化トリプトファンを表す。ペプチド16Tは、レセプター結合に関するPDGFとの競合で、はるかに効率がよい。トリプトファンが2-ニトロフェニルスルフェニルに結合した変形16NPT

も、アンタゴニストとしてペプチド16より活性である。このような誘導体が、活性である当初のペプチド16に優る理由は容易に説明できない。上記13アミノ酸配列が阻害/アンタゴニスト活性の鍵のようである。上記のようなC末端アミノ酸の更なる欠失は、ペプチドの不溶性化をもたらし、従って評価できなかつた。N末端での切断は活性の喪失を生じた。

以前の研究で、ペプチドのβ鎖のアミノ酸105~144が、βレセプターの相互作用に重要なことが示された(ラロッシュエリ他、サイエンス248:1541~1544(1990))。さらに別の研究で、結合に重要なものとしてAsn-115、Arg-154およびIle-158が特定された(イストマン他、ジェイ・バイオ・ケム266:10073~10077(1991)) (Oestman et al., J. Bio. Chem.

em. 266: 10073-10077(1991))。特に好適なペプチド16はPDGF-Bのβミノ酸116~121および157~163を含み、従ってイストマン他に重要であると特定されたものに近いいくつかのアミノ酸を含む。しかし、発明の誘導体はαおよびβレセプターの両方との結合を阻害するという、この分野の先行研究で認識されなかった性質をもつ点に

留意しなければならない。また、本書で提示された証拠は、ペプチド構造のわずかな改変でも、アンタゴニストの活性に深遠な影響を及ぼす。そのようなペプチドのアンタゴニスト的効力は、過剰な、あるいは望ましくないPDGF活性により特徴づけられる症状での使用を示唆する。これらの症状は、上記「背景」部に記載したもの、そして慢性的炎症状態を含む。

PDGF-Bについての観察結果に関連して、血管内皮成長因子(血管透過性因子またはVEGF; ケック他、サイエンス246:1309~1312(1989)); リュング他、サイエンス246:1306~1309(1989) (Leck et al., Science 246: 1309-1312(1989); Leung et al., Science 246: 1306-1309 (1989)) を参照) および胎盤成長因子(マグリオン他、PNAS 88: 9267-9271(1991))を含む他の分子が、PDGF-Bのものと同等のシステイン構造を示すことに留意しなければならない。本書で示される観察結果は、構造的類似性がある場合、これらの分子との相関を示唆する。

PDGF-A単量体は変成PDGF-B単量体ほどの活性がまったく無かつたが、部分還元されたアルキル化

PDGF-A単量体は、ある程度の活性を示した。

上記の例は、特に、PDGF二量体の形成に隣与するクロス分子結合の特質的パターンが存在することを示している。この観察結果は、アンタゴニスト的二量体を形成する能力についての観察結果とともに利用できる。例えば、鎖のひどつがアンタゴニストを生成するよう変成された場合、ヘテロダイマーPDGF-A Bの生成を制御できる。二量体におけるクロス結合の認識により、二量体が

単一の分子間結合のみを含むという唯一の制約の下で、専らPDGF-A-Bの形を生成できる。第2または第4の野生型位置でシステインが欠けているひとつの単量体をコード化する核酸分子と、他のリストされた野生型システイン位置でシステインが欠けている別の分子との細胞への共感染は、PDGF-A-Bの高い生成を保証する。例えば、第1の配列が、第2位置にシステインがないPDGF-Aと、第4位置にシステインがないPDGF-Bとをコード化する場合でも、PDGF-Aの第4システインがPDGF-Bの第2位置を結合できるので、PDGF-A-Bの二量体が形成される。他方、必要な第4システインは存在するが、第2システインが消えているので、二量体のPDGF-Aは形成されない。同様に、そのようなシステムにPDGF-BBはで

きない。第2システインと第4システインがない以外は変成されていない核酸配列の共感染によっても、当然ホモ二量体形を生成できる。また、それぞれが異なる核酸配列を持った2つの別個の細胞サンプルを感染させて、例えば倍体で二量化を引き起こすこともできる。従って、発明のひとつの側面は、別々の核酸部分が望ましい単量体をコード化する、上記二量体生成のためのキットにある。

従って、本発明は、本書に記載の原理に従って生成された、つまり単一の分子間ジスルフィド結合を持ったアンタゴニスト二量体を包含する。システイン残基用に配列されたアミノ酸位置は、別のアミノ酸の置換、欠失、遮断等で単に変成を必要とするだけである。そのようなPDGF-AA分子は結合で結合することが証明されている。これらの分子からアンタゴニストを設計でき、そこではひとつの鎖が、例えば位置156〜162におけるレセプタへの結合を防止するようさらに変成される。これは、いずれかの分子のシステイン2またはシステイン4を変成することで、野生型鎖を持った特異的ヘテロダイマーの形成に使用できる。

また、上記開示は、PDGFに対するアンタゴニストとして機能する種々のアミノ酸含有分子の開発を教示し

ている。これらの分子のあるものはPDGF-Aに、他のものはPDGF-Bに

拮抗する。アンタゴニストは単量体でも二量体でもよい。とくに興味を引くのは、単一のシステイン結合によってつながれた二量体と、PDGF-AまたはPDGF-Bのアミノ酸156〜162によって形成される鎖位が何らかの形に変成された分子である。本書で使用する「変成」は最も広い意味を持つもので、全体的または部分的欠失、および他のアミノ酸による部分的または全体的置換を含む。他の配列による置換に關し、配列KFHQGHが特に望ましい。しかし、アミノ酸の同類置換と、これらアミノ酸のいずれか又はすべてを同類置換で交換することが本発明に含まれることは明かである。

上記変成を含有するアンタゴニストは単量体または二量体の形で使用でき、本書で「PDGF-OB」と呼ぶ二量体分子が特に望ましい。しかし、アミノ酸の同類置換と、これらアミノ酸のいずれか又はすべてを同類置換で交換することが本発明に含まれることは明かである。

上記変成を含有するアンタゴニストは単量体または二量体の形で使用でき、本書で「PDGF-OB」と呼ぶ二量体分子が特に望ましい。そのようなすべての二量体のPDGFアンタゴニストは、PDGFレセプタと結合

することと、これらのレセプタの二量化を阻害する能力によって特徴づけられている。レセプタの二量化はPDGF活性、従ってアンタゴニスト効果に必要である。本書に記載したアンタゴニストは、例えば、それをコード化する核酸配列の発現を通してつくれる。これらの配列はプラスミド等の発現ベクターに組み込み、これによってコード化配列がプロモーターに作用的に連鎖する。発現ベクターおよび核酸配列自体、アンタゴニストを製造する細胞系を生成するよう、感染剤として機能できる。COS細胞等の真核細胞が望ましい。

本発明のアンタゴニストが二量体の形で使用できることを以上で指摘した。二量体を使用する場合、一方の単量体が正常のPDGF単量体で、他方が変成されることが望ましい。そのような二量体は、1つの正常なPDGF分子と1つの変成された分子を生成する宿主細胞を使用して、組替えて生成できる。二量体は、例えば適当な核酸の共感染、または第2の変成分子をコード化する核酸を持った1つの正常なPDGF分子を再生する細胞の感染によって生成できる。PDGF

—AまたはPDGF-Bが正常な単量体として、また変成された単量体として使用できる。発明のひとつの側面は、当業者がそのような二量体をつくれるようなキットを提供することにある。

その最も広い意味において、そのようなキットは、望ましくは発現ペクターの形の、両方のPDGF単量体の核酸配列を含む。また、そのようなキットは、当業者に知られているような、細胞の感染に有用な追加的試薬を含むことができる。

上記で言及したような本発明のアンタゴニストの他の用途に加えて、例は、PDGF-Bに対するアンタゴニストの投与を通して、PDGF-B連鎖細胞の形質転換を緩和し、復帰できることを示している。従って、発明のひとつの側面は、対象におけるPDGF-Bの悪影響を抑制する方法であって、PDGF-Bの影響を抑制するに十分な量のPDGF-Bアンタゴニストを対象に投与することからなるものである。細胞の形質転換はひとつのそのような悪影響である。その他は、この出願に必要を示したような、公知のものである。発明の他の側面は当業者に明かであり、詳述を必要としない。

採用された用語や表現は説明のためで、限定を意図したものではない。そのような用語や表現の使用に、示され記載された特徴またはその一部のいかなる均等物をも除外する意図はなく、発明の範囲内で種々の改変が可能である。

(1) 一般情報 :

- (i) 出願人 :  
 ファスヴォトン、フレミング、エス  
 アンダーソン、マリア  
 バックストローム、グドロン  
 エンクストローム、ウラ  
 ヘルディン、カール - ヘンリック  
 ヘルマン、ウルフ  
 オースタマン、アルヌ  
 ウエスタマック、ベンクト
- (ii) 発明の名称 : 血小板由来の増殖因子アンタゴニ  
 スト

(iii) 配列の数 : 11

- (iv) 連絡先 :  
 (A) 宛名 : フェルフェ・アランド・リンチ  
 (B) 通り名 : サード・アベニュー 805  
 (C) 都市名 : ニューヨーク・シティ  
 (D) 州名 : ニューヨーク  
 (E) 国名 : アメリカ合衆国  
 (F) 郵便番号 : 10022
- (v) コンピュータ読み取り可能フォーマット  
 (A) 媒体形式 : 5.25 インチ フロッピーディスク、  
 360 kb メモリ  
 (B) コンピュータ : IBM PS/2  
 (C) オペレーティング・システム : PC-DOS  
 (D) ソフトウェア : ワードパーフェクト (Wordperfect)

(vi) 現在の出願データ :

- (A) 出願番号 : 07/977,234
- (B) 出願日 : 1992年11月16日
- (C) 分類 : 514
- (vii) 弁護士 / 代理人情報 :  
 (A) 氏名 : ハンソン、ノーマン・ディ  
 (B) 登録番号 : 30,946  
 (C) 参照 / 書類番号 : LUD 269.1
- (ix) 通信情報 :  
 (A) 電話 : (212) 688-9200  
 (B) ファックス : (212) 838-3884

(2) 配列認識番号 1 の情報:

- (i) 配列の特長: 14アミノ酸
- (A) 長さ: アミノ酸
- (B) 種類: 直線
- (D) 位相: タンパク質
- (ii) 分子の種類: 配列認識番号 1:
- (xi) 配列の記述:

Ala Asn Phe Leu Val Trp Xaa Glu Ile Val Arg Lys Lys Pro  
5 10

(2) 配列認識番号 2 の情報:

- (i) 配列の特長: 14アミノ酸
- (A) 長さ: アミノ酸
- (B) 種類: 直線
- (D) 位相: タンパク質
- (ii) 分子の種類: 配列認識番号 2:
- (xi) 配列の記述:

Ala Asn Phe Leu Val Xaa Xaa Glu Ile Val Arg Lys Lys Pro  
5 10

(2) 配列認識番号 3 の情報:

- (i) 配列の特長: 13アミノ酸
- (A) 長さ: アミノ酸
- (B) 種類: 直線
- (D) 位相: タンパク質
- (ii) 分子の種類: 配列認識番号 3:
- (xi) 配列の記述:

Ala Asn Phe Leu Val Trp Glu Ile Val Arg Lys Lys Pro  
5 10

(2) 配列認識番号 4 の情報:

- (i) 配列の特長: 13アミノ酸
- (A) 長さ: アミノ酸
- (B) 種類: 直線
- (D) 位相: タンパク質
- (ii) 分子の種類: 配列認識番号 4:
- (xi) 配列の記述:

Ala Asn Phe Leu Val Xaa Glu Ile Val Arg Lys Lys Pro  
5 10

(2) 配列認識番号 5 の情報:

- (i) 配列の特長: 29アミノ酸
- (A) 長さ: アミノ酸
- (B) 種類: 直線
- (D) 位相: タンパク質
- (ii) 分子の種類: 配列認識番号 5:
- (xi) 配列の記述:

Ala Asn Phe Leu Val Xaa Pro Cys Val Glu Val Gln Leu Arg Pro  
5 10 15

Val Gln Val Arg Lys Ile Gly Ile Val Arg Lys Lys Pro  
20 25



## (2) 配列認識番号 6 の情報:

- (i) 配列の特徴:  
 (A) 長さ: 29 アミノ酸  
 (B) 種類: アミノ酸  
 (D) 位相: 直線  
 (ii) 分子の種類: タンパク質  
 (xi) 配列の記述: 配列認識番号 6:

Ala Asn Phe Leu Val Trp Pro Cys Val Glu Val Cln Leu Arg Pro  
 5 10 15

Val Cln Val Arg Lys Ile Gly Ile Val Arg Lys Lys Pro  
 20 25

## (2) 配列認識番号 7 の情報:

- (i) 配列の特徴:  
 (A) 長さ: 125 アミノ酸  
 (B) 種類: アミノ酸  
 (D) 位相: 直線  
 (ii) 分子の種類: タンパク質  
 (xi) 配列の記述: 配列認識番号 7:

Ser Ile Glu Glu Ala Val Pro Ala Val Cys Lys Thr Arg Thr Val Ile  
 5 10 15

Tyr Glu Ile Pro Arg Ser Cln Val' Asp Pro Thr Ser Ala Asn Phe Leu  
 20 25 30

Ile Trp Pro Cys Val Glu Val Lys Arg Cys Thr Gly Cys Cys Asn  
 35 40 45

Thr Ser Ser Val Lys Cys Cln Pro Ser Arg Val His Arg Ser Val  
 50 55 60

Lys Val Ala Lys Val Cln Tyr Val Arg Lys Lys Pro Lys Leu Lys Glu  
 65 70 75 80

Val Cln Val Arg Leu Glu Glu His Leu Glu Cys Ala Cys Ala Thr Thr  
 85 90 95

Ser Leu Asn Pro Asp Tyr Arg Glu Glu Asp Thr Gly Arg Pro Arg Glu  
 100 105 110

Ser Gly Lys Lys Arg Lys Arg Leu Lys Pro Thr  
 115 120 125

## (2) 配列認識番号 8 の情報:

- (i) 配列の特徴:  
 (A) 長さ: 125 アミノ酸  
 (B) 種類: アミノ酸  
 (D) 位相: 直線  
 (ii) 分子の種類: タンパク質  
 (xi) 配列の記述: 配列認識番号 8:

Ser Ile Glu Glu Ala Val Pro Ala Val Cys Lys Thr Arg Thr Val Ile  
 5 10 15

Tyr Glu Ile Pro Arg Ser Cln Val Asp Pro Thr Ser Ala Asn Phe Leu  
 20 25 30

Ile Trp Pro Pro Cys Val Glu Val Lys Arg Cys Thr Gly Cys Cys Asn  
 35 40 45

Thr Ser Ser Val Lys Cys Cln Pro Ser Arg Val His Arg Ser Val  
 50 55 60

Lys Val Ala Lys Val Glu Tyr Val Arg Lys Lys Pro Lys Leu Lys Glu  
 65 70 75 80

Val Cln Val Arg Leu Glu Glu His Leu Gly Cys Ala Cys Ala Thr Thr  
 85 90 95

Ser Leu Asn Pro Asp Tyr Arg Glu Glu Asp Thr Gly Arg Pro Arg Glu  
 100 105 110

Ser Gly Lys Lys Arg Lys Arg Leu Lys Pro Thr  
 115 120 125

(2) 配列認識番号 9 の情報:

- (i) 配列の特徴:
  - (A) 長さ: 125アミノ酸
  - (B) 種類: アミノ酸
  - (D) 位相: 直線
- (ii) 分子の種類: タンパク質
- (xi) 配列の記述: 配列認識番号 9:

Ser Ile Glu Ala Val Pro Ala Val Xaa Thr Arg Thr Val Ile  
5 10 15

Tyr Gly Ile Pro Arg Ser Gln Val Asp Pro Thr Ser Ala Asn Phe Leu  
20 25 30

Ile Trp Pro Pro Cys Val Gly Val Lys Arg Xaa Thr Gly Xaa Xaa Asn  
35 40 45

Thr Ser Ser Val Lys Xaa Gln Pro Ser Arg Val His His Arg Ser Val  
50 55 60

Lys Val Ala Lys Val Glu Tyr Val Arg Lys Lys Pro Lys Leu Lys Glu  
65 70 75 80

Val Gln Val Arg Leu Glu Glu His Leu Glu Xaa Ala Xaa Ala Thr Thr  
85 90 95

Ser Leu Asn Pro Asp Tyr Arg Glu Glu Asp Thr Gly Arg Pro Arg Glu  
100 105 110

Ser Gly Lys Lys Arg Lys Arg Lys Arg Leu Leu Pro Thr  
115 120 125

(2) 配列認識番号 10 の情報:

- (i) 配列の特徴:
  - (A) 長さ: 7アミノ酸
  - (B) 種類: アミノ酸
  - (D) 位相: 直線
- (ii) 分子の種類: タンパク質
- (xi) 配列の記述: 配列認識番号 10:

Gly Tyr Val Arg Lys Lys Pro  
5

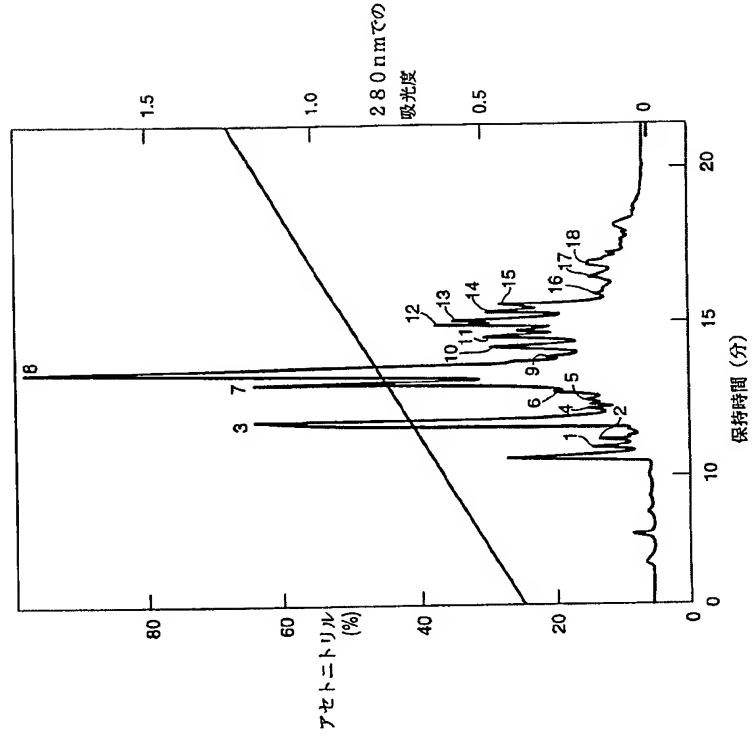
(2) 配列認識番号 11 の情報:

- (i) 配列の特徴:
  - (A) 長さ: 7アミノ酸
  - (B) 種類: アミノ酸
  - (D) 位相: 直線
- (ii) 分子の種類: タンパク質
- (xi) 配列の記述: 配列認識番号 11:

Lys Pro His Gln Gly Gln His  
5

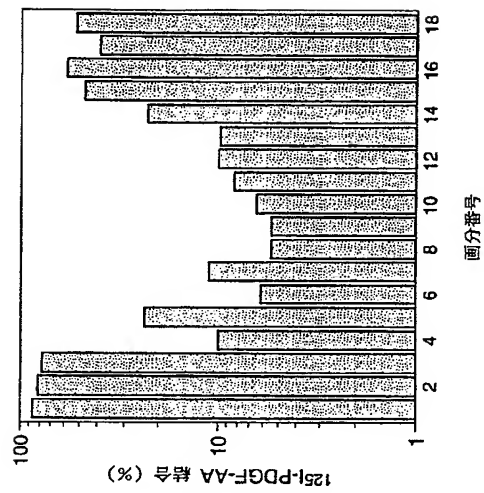
【図1】

FIG. 1



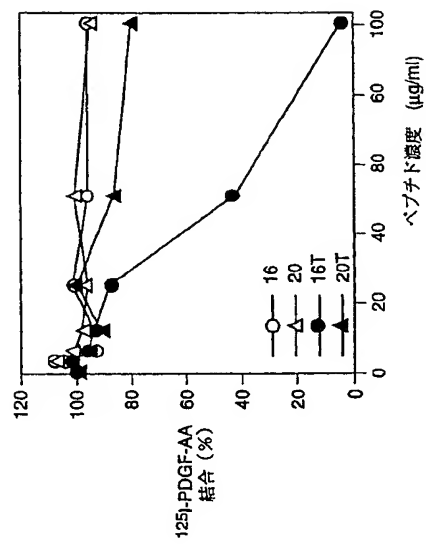
【図2】

FIG.2



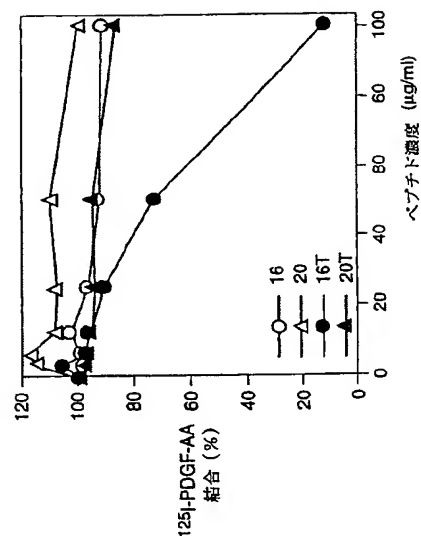
【図3A】

FIG.3A

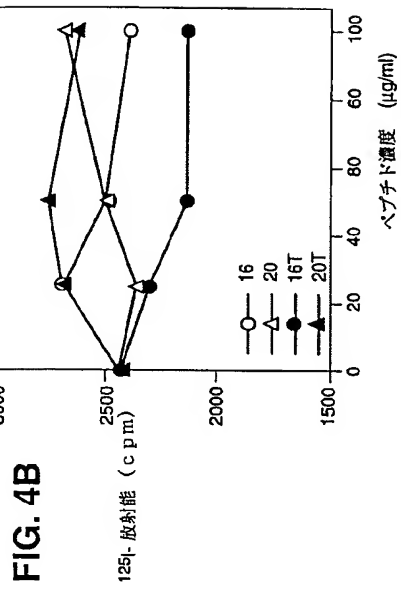


【図3B】

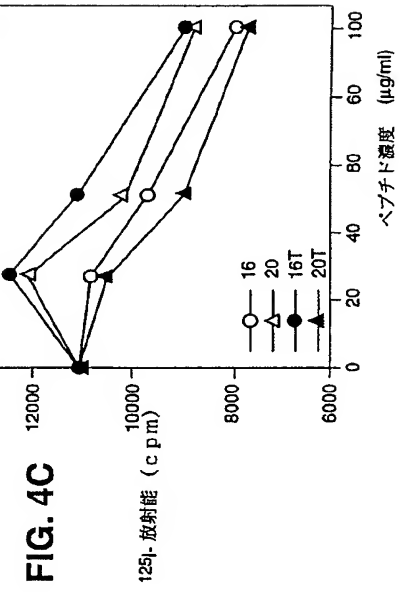
FIG.3B



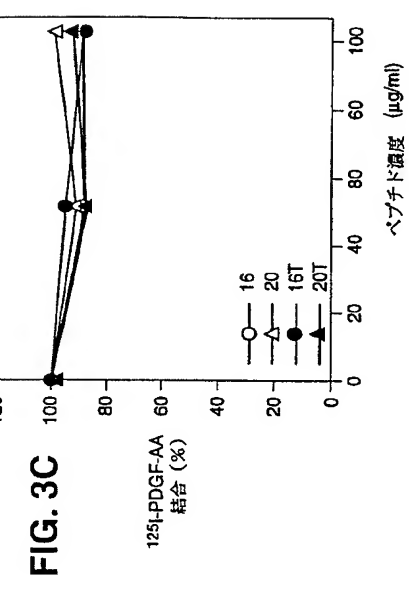
【図4B】



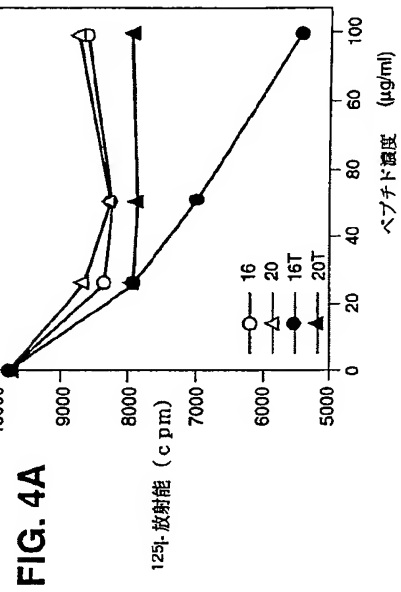
【図4C】



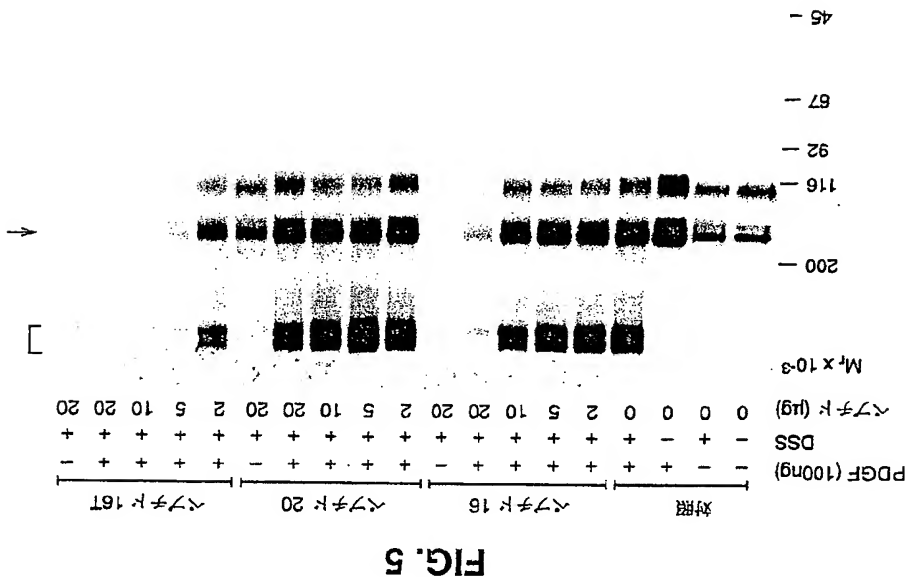
【図3C】



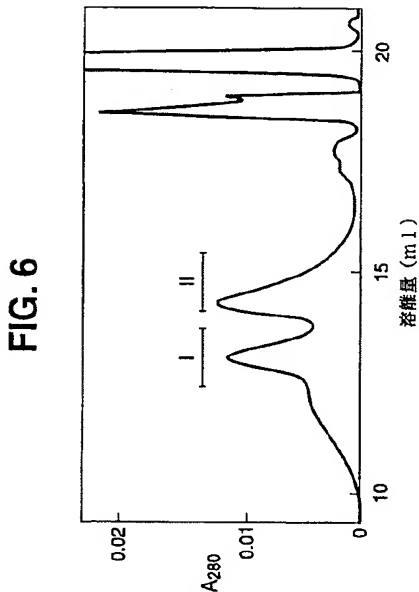
【図4A】



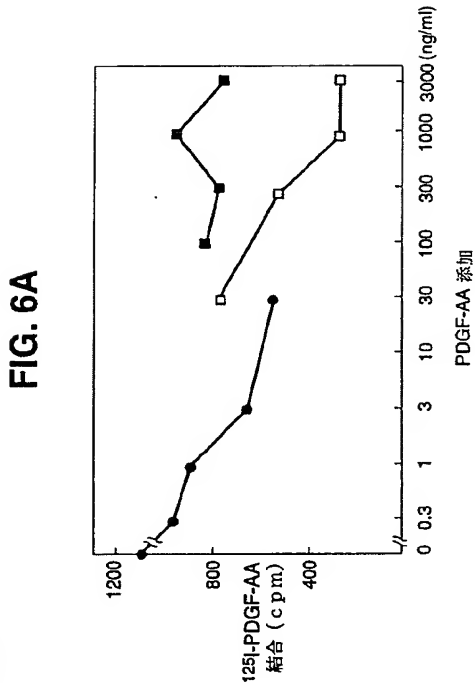
【図5】



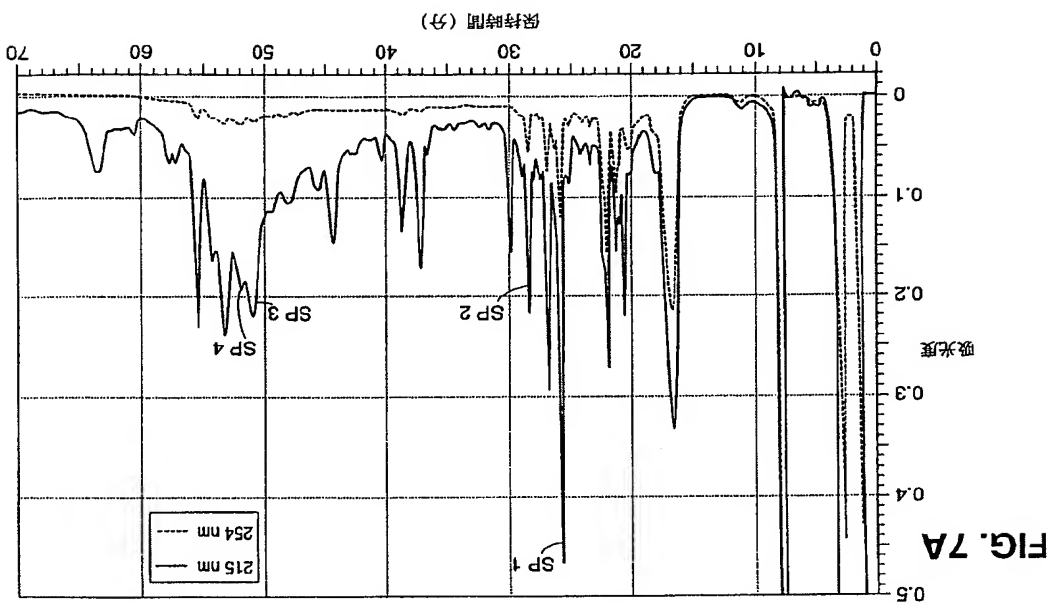
【図6】



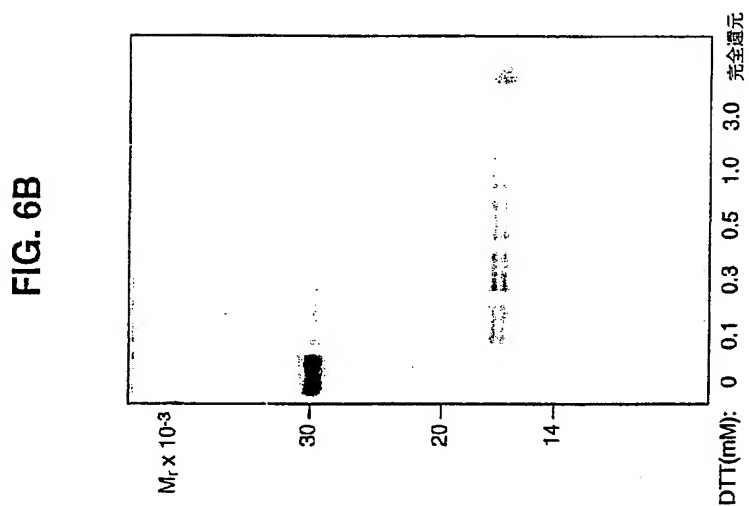
【図6A】



【図7A】



【図6B】



【図 7 B】

FIG. 7B

```
SIEEAVPAVCKTRTVIYEIPRSQVDPTSANFLIWP
      sp4 -----
PCVEVKRCTGCCNTSSVKCQPSRVHHRSVKVAKE
      sp1 -----
      # -----
YVRKKPKLKEVQVRLEEHLECACATTSLNPDYREE
      sp2 @ - @ -----
DTGRPRESGKKRRKRLKPT
```

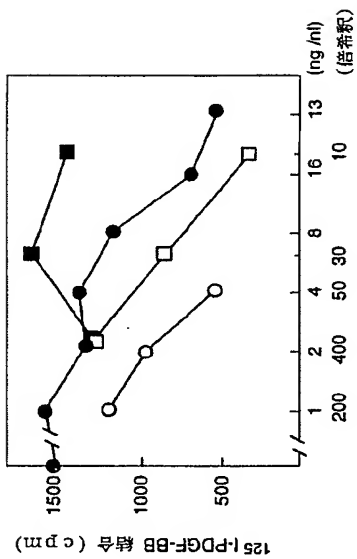
【図 8 A】

FIG. 8A



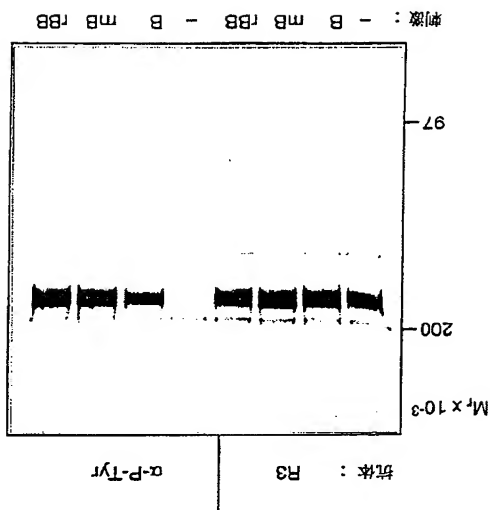
【图 9】

FIG.9



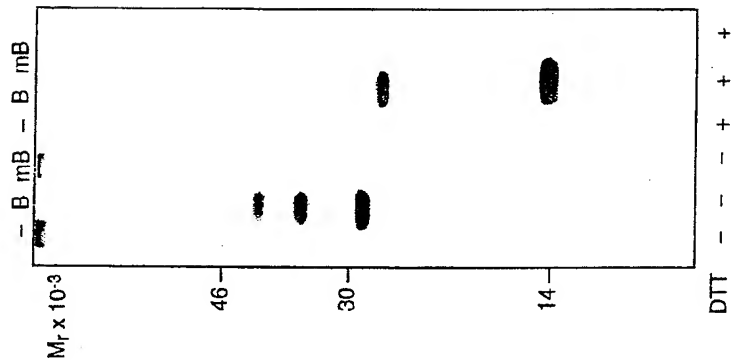
【图 10A】

FIG. 10A



【图 8B】

FIG. 8B

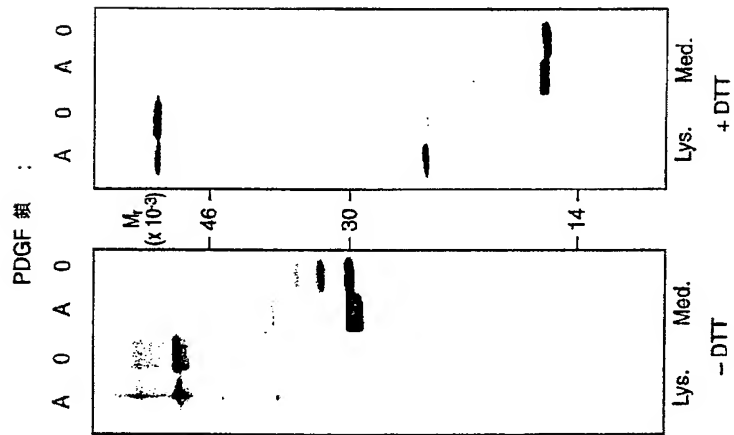






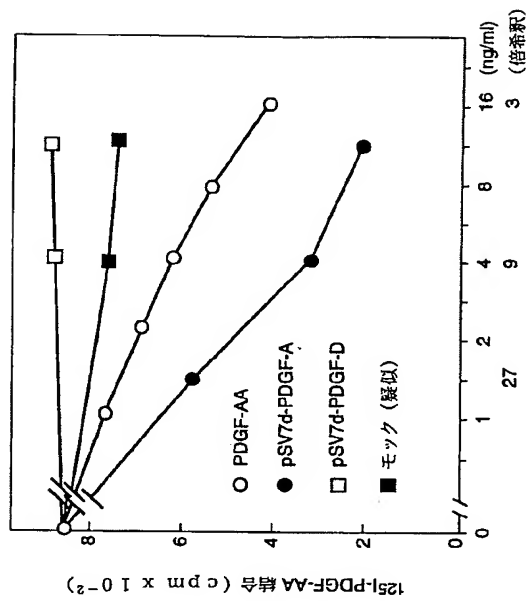
【図13】

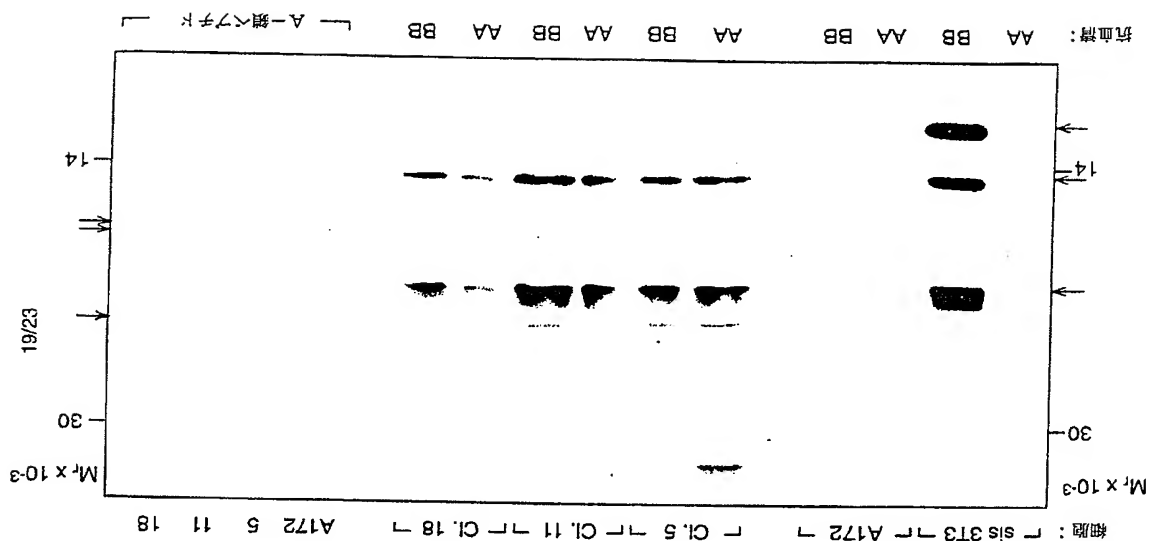
FIG. 13



【図14】

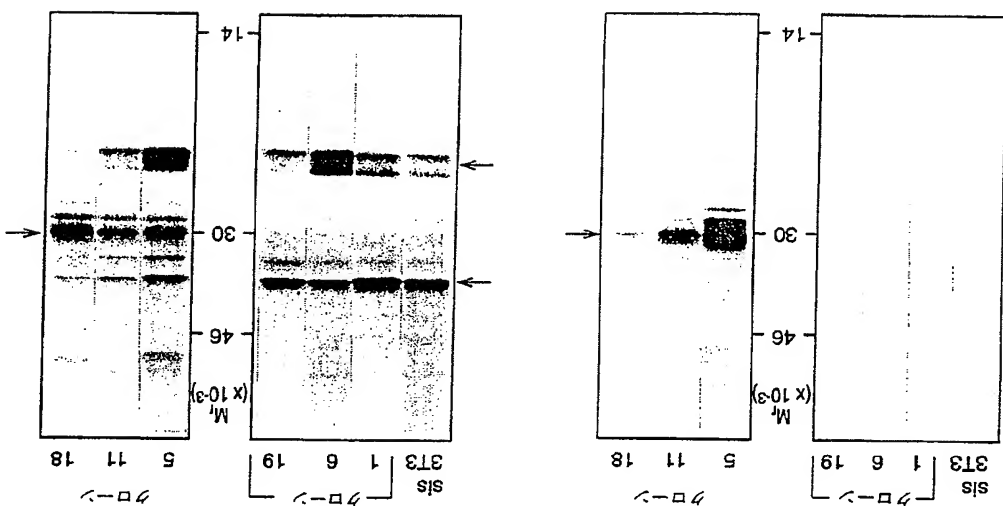
FIG. 14





**FIG. 16**

【916】



**FIG. 15B**

【☒】 5 B

**FIG. 15A**

【☒15A】

【図17C】



FIG. 17C

【図17A】



FIG. 17A

【図17D】

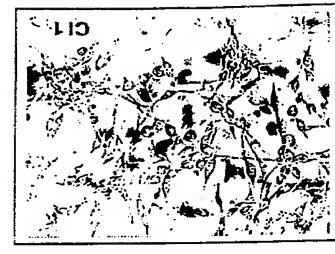


FIG. 17D

【図17B】



FIG. 17B

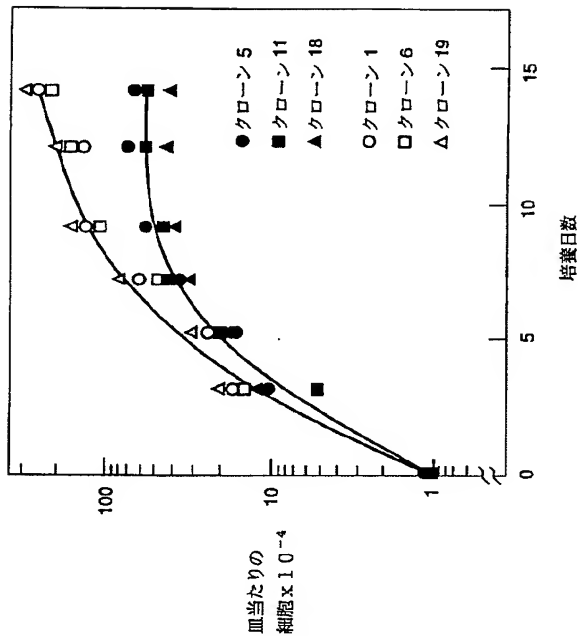
【図17E】



FIG. 17E

【図18】

FIG. 18



【図19A】

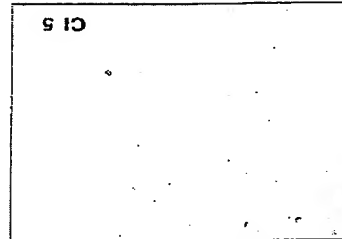


FIG. 19A

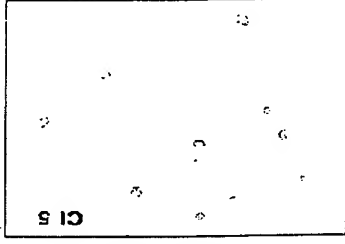


FIG. 19D

【図19D】

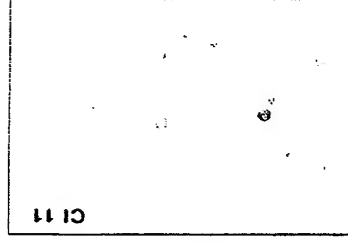


FIG. 19E

【図19E】

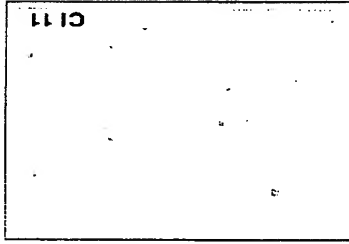


FIG. 19B

【図19B】

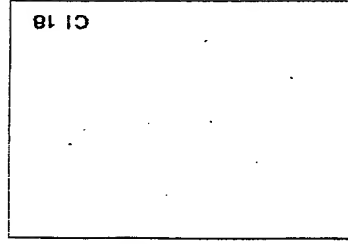


FIG. 19C

【図19C】

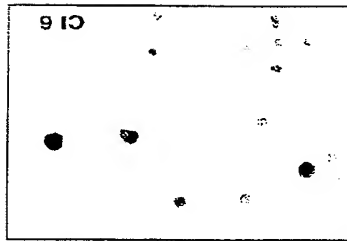


FIG. 19H

【図19H】

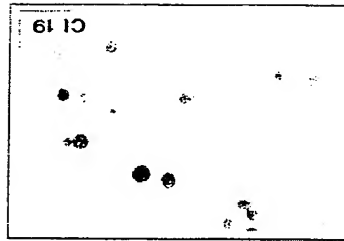


FIG. 19I

【図19I】

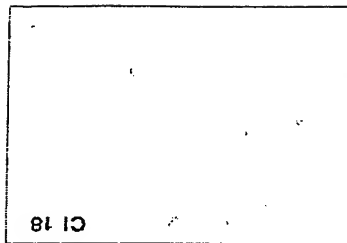


FIG. 19F

【図19F】

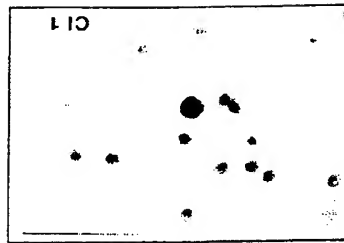


FIG. 19G

【図19G】

## 【手続補正書】特許法第184条の7第1項

【提出日】1993年9月7日

## 【補正内容】

## 補正特許請求の範囲

[1993年9月7日(07.09.93)に国際事務局が受領：当初の請求

項1～84が補正請求項1～43に替えられ、そのうち請求項1、2、16～1

8、21、22、24、26、28、29、32～40、42～54、62～6

4、66、68～73、75および77～84が削除され、新請求項6～8、2

2～28、30、37および39～42が追加された(5ページ)]

1. 血小板由来の増殖因子に対する以下のアミノ酸配列からなるペプチドアン  
 タゴニスト Ala Asp Phe Leu Val Xaa Xaa Xaa Gl  
 u Ile Val Arg Lys Lys Pro、

ここで、最初のXaaはトリプトファンまたは変成トリプトファン、2番目のX  
 aaは0から35アミノ酸のいずれかである。

2. 2番目のXaaがOアミノ酸である請求項1のアンタゴニスト。

3. 最初のXaaがトリプトファン、チオアニソール化トリプトファンまたは  
 トリプトファンの2-ニトロフェニル塩化スルフェニル誘導体である請求項1ま  
 たは2のアンタゴニスト。

4. 2番目のXaaがPro Pro Cys Val Glu Val G  
 In Leu Arg Pro Val Gln Val Arg Lys I  
 le

である請求項1のアンタゴニスト。

5. 最初のXaaが チオアニソール化トリプトファンか2-ニトロフェニル  
 スルフェニルトリプトファン誘導体である請求項1のアンタゴニスト。

6. 最初のXaaがトリプトファンである請求項1、2、3または4のいずれ  
 かのアンタゴニスト。

7. 請求項6のアンタゴニストをコード化する分離された核酸分子。

8. 請求項7の分離された核酸分子からなる、プロモーターに作用的に連鎖し

た発現ベクトル。

9. PDGF $\alpha$ および $\beta$ レセプタを提示する細胞へのPDGF結合を阻害する

方法であって、前記細胞に対するPDGF Bの結合を阻止するに十分な量の、

請求項1、2、3、4、5または6のいずれかのアンタゴニストに前記細胞を接  
 触させることからなるもの。

10. いずれかの単量体上のアミノ酸123か、いずれかの単量体上のアミノ酸

132の少なくとも一方がシステインでなく、前記変成二量体が野生型PDGF

AAに対するアンタゴニストである、分離された変成

PDGF AA二量体。

11. 一方の単量体上のアミノ酸123と他方の単量体上のアミノ酸132がシ  
 ステインでない請求項10の分離された変成PDGF AA二量体。

12. いずれかの単量体上のアミノ酸124か、いずれかの単量体上のアミノ酸

133の少なくとも一方がシステインでなく、前記変成二量体が野生型PDGF

BBに対するアンタゴニストである、分離された変成PDGF BB二量体。

13. 一方の単量体上のアミノ酸124と他方の単量体上のアミノ酸133がシ  
 ステインでない請求項12の分離された変成PDGF BB二量体。

14. (i) PDGF Aの単量体またはPDGF Bの単量体 と (ii) 非  
 PDGF単量体からなり、前記2つの単量体が1個のジスルフィド結合によって

つながれ、前記二量体がPDGFアンタゴニストである、分離された二量体。

15. 前記非PDGF単量体が増殖因子である請求項14の分離された二量体。

16. 前記非PDGF単量体がVEGFである請求項14の分離された二量体。

17. アミノ酸位置156～162で変成されたPDGF

単量体からなる分離されたペプチド。

18 位置156～162にアミノ酸配列KPHQQGを持つ請求項17の分  
 離されたペプチド。

19. 前記単量体がPDGF Aである請求項17または18の分離されたペプ  
 チド。



20. 前記単体がPDGF-Bである請求項17または18の分離されたペプチド。

21. 以下のものからなる分離された二重体、

(i) PDGF-AまたはPDGF-Bの一方、および

(ii) 請求項17、18、19または20のいずれかの分離されたペプチド。

22. 2個の変成PDGF-A単体からなり、アミノ酸123および132の少なくとも一方がシステインでないように前記単体の一方が変成され、アミノ酸位置156〜162で前記単体の一方が変成された、分離された二重体。

23. 2個の変成PDGF-B単体からなり、アミノ酸124および133の少なくとも一方がシステインでないように前記単体の一方が変成され、アミノ酸位置156〜162で前記単体の一方が変成された、分離された二重体。

24. 位置156〜162で変成された単体が、前記位置にアミノ酸配列KHQGHを持つ請求項22または23のいずれかの二重体。

25. 以下のものからなる分離された二重体、

(i) (a) アミノ酸位置123および132の少なくとも一方で、前記位置の前記少なくとも一方がシステインでないように変成されたPDGF-Aと、

(b) アミノ酸位置124および133の少なくとも一方で、前記位置の前記少なくとも一方がシステインでないように変成されたPDGF-Bのうちの一方、そして

(ii) 請求項17、18、19または20のいずれかの分離されたペプチド。

26. 請求項7の核酸配列または請求項8の発現ベクトルに感染した細胞系。

27. 前記細胞系にPDGF-AおよびPDGF-Bのいずれかをコード化する核酸分子にさらに感染した請求項26の細胞系。

28. 前記細胞系がPDGF-AまたはPDGF-Bの少なくとも一方を生成する請求項26の細胞系。

29. 請求項21、22、23、24または25のいずれかの二重体を生成する

のに有用なキットであって、

それぞれが前記二重体の単体をコード化する1対の核酸分子からなるもの。

30. 請求項17、18、19または20のペプチドをコード化する分離された核酸分子。31. 変成PDGF-B単体からなり、アミノ酸124および133がシステインでない、分離された血小坂由来の増殖因子アゴニスト。

32. 位置124および133のアミノ酸がそれぞれセリンである請求項31の分離されたアゴニスト。

33. 位置124および133のアミノ酸の一方がセリンである請求項31の分離されたアゴニスト。

34. 請求項31、32または33のアゴニストをコード化する分離された核酸分子。

35. 請求項31、32または33のアゴニストをコード化するプラスミド。

36. 請求項34の分離された核酸分子または請求項35のプラスミドに感染した細胞系。

37. 請求項30の分離された核酸分子からなる、プロモーターに作用的に連関した発現ベクトル。

38. pSV7d-PDGF-Oで表される請求項37の発現ベクトル。

39. 請求項31の核酸分子または請求項37または37

の発現ベクトルに感染した細胞系。

40. PDGF-Bの悪影響を抑制する方法であって、PDGF-Bの悪影響を抑制するために、請求項25のアンタゴニストの所定量を、それと必要とする患者に投与することからなるもの。

41. 前記悪影響が細胞感染である請求項41の方法。

42. 前記アンタゴニストがPDGFOBである請求項40または41の方法。

43. 細胞に対するPDGF効果を増進する方法であって、前記細胞に対するPDGF効果を増進するに十分な量の、請求項31のPDGFアゴニストを細胞に投与することからなる。

10. 一方の単量体上のアミノ酸123および地方の単量体上のアミノ酸132のそれぞれがジステインでなく、前記変成PDGF-AA二量体が野生型PDGF-AAに対するアンタゴニストである、分離された変成PDGF-AA二量体。
11. (1) PDGF-Aの単量体またはPDGF-Bの単量体、と(11)非PDGF単量体からなり、前記2つの単量体が1個のジスルフィド結合によってつながれ、前記二量体がPDGFアンタゴニストである、分離された二量体。
12. 前記非PDGF単量体が増殖因子である請求項11の分離された二量体。
13. 前記非PDGF単量体がVEGFである請求項11の分離された二量体。
14. アミノ酸位置156~162で変成されたPDGF単量体からなる分離されたペプチド。
15. 位置156~162にアミノ酸配列KPHQGGを持つ請求項14の分離されたペプチド。
16. 前記単量体がPDGF-Aである請求項14または15の分離されたペプチド。
17. 前記単量体がPDGF-Bである請求項14または15の分離されたペプチド。
18. 以下のものからなる分離された二量体、
- (1) PDGF-AまたはPDGF-Bの一方、および
- (11) 請求項14、15、16または17のいずれかの分離されたペプチド。
19. 2個の変成PDGF-A単量体からなり、アミノ酸123および132の少なくとも一方がジステインでないように前記単量体の一方が変成され、アミノ酸位置156~162で前記単量体の一方が変成された、分離された二量体。
20. 2個の変成PDGF-B単量体からなり、アミノ酸124および130の少なくとも一方がジステイン

でないように前記単量体の一方が変成され、アミノ酸位置156~162で前記

- 【手続補正書】特許法第184条の8
- 【提出日】1994年4月25日
- 【補正内容】
- 請求の範囲
1. 血小板由来の増殖因子に対する以下のアミノ酸配列からなるペプチドアンタゴニスト Ala Asp Phe Leu Val Xaa Xaa Glu Ile Val Arg Lys Lys Pro、
- ここで、最初のXaaはトリプトファンまたは変成トリプトファン、2番目のXaaは0から35アミノ酸のいずれかである。
2. 2番目のXaaが0アミノ酸である請求項1のアンタゴニスト。
3. 最初のXaaがトリプトファン、チオアニソール化トリプトファンまたはトリプトファンの2-ニトロフェニル塩化スルフェニル誘導体である請求項1または2のアンタゴニスト。
4. 2番目のXaaがPro Pro Cys Val Glu Val Glu Leu Arg Pro Val Gln Val Arg Lys Ile
- である請求項1のアンタゴニスト。
5. 最初のXaaがチオアニソール化トリプトファンか2-ニトロフェニルスルフェニルトリプトファン誘導体である請求項1のアンタゴニスト。
6. 最初のXaaがトリプトファンである請求項1、
- 2、3または4のいずれかのアンタゴニスト。
7. 請求項6のアンタゴニストをコード化する分離された核酸分子。
8. 請求項7の分離された核酸分子からなる、 프로모ターに作用的に連関した発現ベクター。
9. PDGF $\alpha$ および $\beta$ レセプタを提示する細胞へのPDGF結合を阻害する方法であって、前記細胞に対するPDGF-Bの結合を阻止するに十分な量の、
- 請求項1、2、3、4、5または6のいずれかのアンタゴニストに前記細胞を接触させることからなるもの。

単量体の一方が変成された、分離された二量体。

21. 位置156～162で変成された単量体が、前記位置にアミノ酸配列K P H Q G Q Hを持つ請求項19または20のいずれかの二量体。

22. 以下のものからなる分離された二量体、

(1) (a) アミノ酸位置123および132の少なくとも一方で、前記位置の前記少なくとも一方がシステインでないように変成されたP D G F-Aと、

(b) アミノ酸位置124および133の少なくとも一方で、前記位置の前記少なくとも一方がシステインでないように変成されたP D G F-Bのうちの一方、そして

(11) 請求項14、15、16または17のいずれかの分離されたペプチド。

23. 請求項7の核酸配列または請求項8の発現ベクターに感染した細胞系。

24. 前記細胞系にP D G F-AおよびP D G F-Bのいずれかをコード化する核酸分子にさらに感染した請求項23の細胞系。

25. 前記細胞系がP D G F-AまたはP D G F-Bの

少なくとも一方を生成する請求項23の細胞系。

26. 請求項18、19、20、21または22のいずれかの二量体を生成するのに有用なキットであって、それぞれが前記二量体の単量体をコード化する1対の核酸分子からなるもの。

27. 請求項14、15、16または17のペプチドをコード化する分離された核酸分子。28. 変成P D G F-B単量体からなり、アミノ酸124および133がシステインでない、分離された血小板由来の増殖因子アゴニスト。

29. 位置124および133のアミノ酸がそれぞれセリンである請求項28の分離されたアゴニスト。

30. 位置124および133のアミノ酸の一方がセリンである請求項28の分離されたアゴニスト。

31. 請求項28、29または30のアゴニストをコード化する分離された核酸分子。

32. 請求項28、29または30のアゴニストをコード化するプラスミド。

33. 請求項31の分離された核酸分子または請求項32のプラスミドが感染された細胞系。

34. 請求項27の分離された核酸分子からなる、プロモーターに作用的に関連した発現ベクター。

35. p S V 7 d-P D G F-Oで表される請求項34の発現ベクター。

36. 請求項28の核酸分子または請求項34または38の発現ベクターが感染された細胞系。

37. P D G F-Bの悪影響を抑制する方法であって、P D G F-Bの悪影響を抑制するために、請求項23のアントゴニストの所定量を、それを必要とする患者に投与することからなるもの。

38. 前記悪影響が細胞感染である請求項37の方法。

39. 前記アントゴニストがP D G F O Bである請求項37または38の方法。

40. 細胞に対するP D G F効果を増進する方法であって、前記細胞に対するP D G F効果を増進するに十分な量の、請求項28のP D G Fアゴニストを細胞に投与することからなるもの。



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US93/04350

Box I. Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This International report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter and required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II. Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

(Telephone Proceeding)  
Please See Exam Sheet.

1. ☒ 2. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not pay in payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the inventions first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet)(July 1992)\*

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US93/04350

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:

US CL.:

4,372.2, 49.1, 49.4, 172.3, 240.2, 252.3, 320.1, 330.34, 351, 399; 3142.12; 51623.3

## BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION WAS LACKING

This ISA found multiple inventions as follows:

- I. Claims 1-34, 39-44, and 78-84, drawn to POCF integrations, a first composition, and a method of inhibiting bleeding, a first method of use, classified in Class 310/224, for example.
- II. Claims 35-53 and 65-75, drawn to DNA molecules, vectors, transformed host cells, and kds, classified in Class 310/223.1, for example.
- III. Claims 54-59, drawn to a method for inhibiting adverse POCF effects, classified in Class 31412, for example.
- IV. Claims 76-77, drawn to a method for enhancing POCF effects, classified in Class 43571.1, for example.

Form PCT/ISA/210 (exam sheet)(July 1992)\*

フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>	特許記号	序内整理番号	F I
C 07 H 21/04	Z	8615-4C	
C 07 K 14/49		8318-4H	
C 12 N 5/10			
15/09			
/(C 12 P 21/02			
C 12 R 1:91)			
		9455-4C	A 61 K 37/02
		9455-4C	37/24
(81) 指定国	EP (A.T., BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), AU, CA, JP		
(72) 発明者	バックストローム, グトルン スウェーデン国 エス・751 25 ウプサ ラ (無番地)		
(72) 発明者	エンダストローム, ウラ スウェーデン国 エス・751 24 ウプサ ラ (無番地)		
(72) 発明者	ヘルデイン, カール・ヘンリック スウェーデン国 エス・751 25 ウプサ ラ (無番地)		
(72) 発明者	ヘルマン, ウルフ スウェーデン国 エス・751 24 ウプサ ラ (無番地)		
(72) 発明者	オストマン, アルヌ スウェーデン国 エス・751 24 ウプサ ラ (無番地)		
(72) 発明者	ウエスタマク, ベンクト スウェーデン国 エス・751 24 ウプサ ラ (無番地)		